

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Daiane Nemen**

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS LIPÍDICOS CONTENDO**  
**RESVERATROL: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E**  
**AValiação DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA**

**Florianópolis**

**2010**



**Daiane Nemen**

**SISTEMAS NANOESTRUTURADOS LIPÍDICOS CONTENDO  
RESVERATROL: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA**

Dissertação apresentada como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia da Universidade Federal  
de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Elenara Lemos Senna

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da

Universidade Federal de Santa Catarina

N433s Nemen, Daiane

Sistemas nanoestruturados lipídicos contendo resveratrol [dissertação]: preparação, caracterização e avaliação da penetração cutânea / Daiane Nemen; orientadora, Elenara Maria Teixeira Lemos Senna. - Florianópolis, SC, 2010.

175 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós- Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Lipídios. 3. Nanoestrutura. 4. Microscopia Confocal. I. Senna, Elenara Maria Teixeira Lemos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Folha de aprovação (Elenara)



*Aos meus pais e minha irmã, por toda a compreensão, preocupação, incentivo, apoio e amor e, em especial, a minha mãe, pela dedicação de parte da sua vida a mim, meu grande exemplo de vida, dedico, mais esta conquista como forma de gratidão.*





## RESUMO

O resveratrol (RV) é um polifenol pertencente à classe dos estilbenos, presente na dieta humana. Esta substância tem demonstrado inúmeras atividades farmacológicas incluindo antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, cardioprotetora, entre outras. Entretanto, a biodisponibilidade oral desta substância é praticamente nula, em decorrência do seu elevado metabolismo colônico e hepático. Por outro lado, estudos relatam os benefícios do RV sobre a pele, fazendo com que a liberação tópica deste composto constitua uma interessante alternativa à administração oral para o tratamento de várias desordens cutâneas. Neste sentido, a nanoencapsulação do RV pode ser considerada uma alternativa promissora para a aplicação tópica cutânea. Neste trabalho, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (NE) e microemulsões (ME) foram preparadas pela técnica de difusão do solvente a quente e avaliadas quanto a sua capacidade de incorporar o RV, assim como de liberar este fármaco através da pele. Visando uma forma farmacêutica para uso tópico, nanogéis foram preparados pela adição de hidroxietilcelulose às dispersões coloidais. Um método analítico por CLAE foi desenvolvido e validado, com o intuito de determinar a concentração de RV nas formulações e monitorar a concentração de fármaco permeado ou retido na pele. O tamanho médio das partículas foi aproximadamente de 221, 119 e 22 nm, para as NLSs, NEs e MEs, respectivamente. Todas as preparações apresentaram potencial zeta negativo. Elevados valores de eficiência de encapsulação foram obtidos para todas as formulações testadas. Entretanto, o teor de RV variou significativamente em função do tipo de nanocarreador e da quantidade de fármaco inicialmente adicionada às formulações. Em especial, a ME apresentou uma maior capacidade de incorporar o RV, aumentando a sua concentração cerca de 28 vezes em relação a sua solubilidade aquosa. As formulações em dispersão e em gel foram avaliadas em estudos de permeação cutânea utilizando células de difusão tipo Franz e pele de orelha de porco como modelo de membrana por um período de 8 horas. O fluxo de permeação, o tempo de latência e o coeficiente de permeabilidade foram estimados após a construção do gráfico da quantidade permeada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* tempo (h). Estudos de microscopia confocal de varredura laser (MCVL) foram realizados no intuito de observar a difusão do fármaco incorporado nas NLSs, NEs e MEs através da pele, utilizando o vermelho de Nilo (VN) como marcador fluorescente. A permeação e a retenção do RV foram significativamente afetadas pelo tipo de nanocarreador lipídico. O fluxo

e o coeficiente de permeabilidade diminuíram na seguinte ordem:  $ME_{RV} < NLS_{RV} < NE_{RV}$ . Por outro lado, a quantidade permeada através da pele aumentou após a aplicação da ME apresentando a mais elevada concentração de fármaco, quando MEs com diferentes teores de RV foram testadas. O tempo de latência não variou para a maioria das formulações, e a quantidade de fármaco retido na pele demonstrou ser significativamente reduzida, somente quando as NLS foram aplicadas. As fotomicrografias obtidas por MCVL evidenciaram a permeação do VN nas camadas profundas da pele quando as dispersões coloidais foram testadas, o que não foi observado com uma solução do mesmo utilizada como controle, em que o marcador fluorescente permaneceu nas camadas superficiais da pele. Além disso, a menor penetração do corante a partir das MEs pode ser visualizada, confirmando os resultados obtidos nos estudos de permeação.

**Palavras-chaves: resveratrol, sistemas nanocarreadores lipídicos, permeação cutânea, microscopia confocal de varredura laser.**

## ABSTRACT

Resveratrol (RV) is a polyphenol belonging to the class of stilbenes, present in the human diet. This substance has shown several pharmacological activities, including among others antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, and cardioprotective activity. However, the oral bioavailability of this compound is very low due to its high pre-systemic metabolism in the colon and liver. On the other hand, RV has shown many benefits for the skin. Topical applied RV has demonstrated to possess strong antiproliferative and chemopreventive properties against skin carcinogenesis, and antimicrobial activity against dermatophytes and herpes simplex virus. Therefore, the cutaneous application of RV constitutes an interesting alternative to oral administration for the treatment of skin disorders. In this work, solid lipid nanoparticles (SLN), nanoemulsions (NE) and microemulsions (ME) containing RV were prepared by the hot solvent diffusion method. The ability of the colloidal suspensions in to incorporate the RV, as well as to release this drug through the skin was evaluated. Nanogels were prepared by adding hydroxyethylcellulose to the colloidal suspensions. A HPLC method was developed and validated to determine the concentration of the RV in the formulations and for monitoring the permeation of the drug through the skin. The average particle size was 221, 119 and 22 nm for SLN<sub>s</sub>, NEs and MEs, respectively. All preparations displayed negative zeta potential values. High values of encapsulation efficiency were obtained for all formulations. However, the drug content was significantly varied, depending on the type of the nanocarrier and amount of drug initially added to the formulations. In particular, ME exhibited greater ability to incorporate RV, increasing its concentration around 28 times as compared to its aqueous solubility. The skin permeation of the RV from colloidal suspensions and nanogels was evaluated using Franz diffusion cells and pig ear skin as a membrane model. The permeation flux, the latency time and permeability coefficient were estimated after the construction of the amount permeated ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* time (h) graphs. Confocal laser scanning microscopy studies (CLSM) were performed in order to visualize the diffusion of a lipophilic drug incorporated into SLN<sub>s</sub>, NEs and MEs through the skin. In this study, Nile red (NR) was employed as a fluorescent marker. The permeation and retention of the RV were significantly affected by the type of lipid-based nanocarrier. The flow and the permeability coefficient decreased in the following order:

$ME_{RV} < SLN_{RV} < NE_{RV}$ . Moreover, the amount permeated through the skin was increased with the application of ME displaying the highest concentration of drug. The latency times were similar for the most formulations, and the amount of drug retained in the skin was significantly reduced only when NLS were applied. The CLSM photomicrographs evidenced the higher permeation of NR in the deep layers of the skin from the colloidal suspensions, when it was compared to the application of a NR solution. Moreover, the lower penetration of the NR from MEs could be visualized, confirming the results obtained in the RV permeation studies.

**Keywords:** resveratrol, lipid-based nanocarriers, cutaneous permeation, confocal laser scanning microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1: Revisão de Literatura

<b>Figura 1.</b> Estrutura química dos isômeros (a) <i>trans</i> -resveratrol e (b) <i>cis</i> -resveratrol.....	12
<b>Figura 2.</b> Representação da pele humana mostrando as diferentes camadas e apêndices.....	20
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da pele mostrando as possíveis rotas de penetração.....	22
<b>Figura 4.</b> Absorção em função do tempo, para o caso simples de ordem zero, obtido pelo gráfico de $m$ , a quantidade cumulativa de difusante atravessando uma unidade de área de membrana. O estado estacionário é alcançado quando o gráfico se torna linear. A extrapolação da porção linear até o eixo do tempo gera o valor do tempo de latência ( $L$ ).....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema de célula de difusão tipo Franz .....	26

### Capítulo 2: Preparação e caracterização de dispersões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea.

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do <i>trans</i> -resveratrol .....	51
<b>Figura 2.</b> Cromatograma típico obtido após injeção de: (a) solução padrão de resveratrol 4,0 µg/mL e (b) NLS, (c) NE, (d) ME e (e) nanogéis sem fármaco.....	60
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografias dos filmes obtidos a partir dos nanogéis de HEC obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de	

campo (MEV-FEG). (a) Gel branco (b) nanogel de NLS (c) nanogel de NE (d) nanogel de ME.....	69
---	----

**Capítulo 3: Skin penetration studies of resveratrol incorporated into lipid-based**

<b>Figure 1.</b> Permeation profiles of resveratrol through pig ear skin from (A) the different lipid-based nanocarriers and their respective nanogels, and (B) microemulsions and nanogels containing different payloads of resveratrol.....	92
---	----

<b>Figure 2.</b> Skin retention of resveratrol from (A) different lipid-based nanocarriers and their respective nanogels, and (B) microemulsions and nanogels containing increasing resveratrol payloads. <sup>a</sup> Significantly different (p < 0.01) as compared RV-SLN nanogel, <sup>b</sup> Significantly lower (p<0.001) as compared to the RV-ME <sub>3</sub> colloidal suspension.....	95
--	----

**Capítulo 4: Investigação do efeito do tipo de nanocarreador lipídico sobre a penetração cutânea do vermelho de nilo usando microscopia confocal de varredura laser**

<b>Figure 1.</b> Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser obtidas após estudos de permeação do vermelho de Nilo a partir das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (NE), e microemulsões (ME) e da solução de VN.....	116
--	-----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1: Revisão de Literatura

<b>Tabela 1.</b> Atividades biológicas do resveratrol .....	13
---	----

### Capítulo 2: Preparação e caracterização de dispersões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea.

<b>Tabela 1.</b> Resultados de recuperação do resveratrol após análise das dispersões coloidais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	61
--	----

<b>Tabela 2.</b> Resultados obtidos na avaliação da precisão do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	62
---	----

<b>Tabela 3.</b> Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos.....	64
---	----

<b>Tabela 4.</b> Resultados de teor e recuperação do resveratrol nas dispersões coloidais de nanocarreadores lipídicos .....	66
--	----

<b>Tabela 5.</b> Resultados da análise da variância realizada para avaliar o efeito do nanocarreador e da quantidade inicial de resveratrol sobre o teor de fármaco nas dispersões coloidais.....	67
---	----

<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos na caracterização do gel de HEC puro e dos nanogéis.....	69
--	----

**Capítulo 3: Skin penetration studies of resveratrol incorporated into lipid-based**

**Table 1.** Formulation composition of resveratrol-loaded lipid-based colloidal suspensions..... 84

**Table 2.** Physicochemical characterization of lipid-based nanocarriers..... 90

**Table 3.** Permeation parameters of resveratrol across the skin obtained with different lipid-based nanocarriers ..... 93

**Table 4.** Permeation parameters of resveratrol across the skin obtained from microemulsions containing increasing resveratrol payloads..... 94

**Capítulo 4: Investigação do efeito do tipo de nanocarreador lipídico sobre a penetração cutânea do vermelho de nilo usando microscopia confocal de varredura laser**

**Table 1.** Composição das formulações de nanocarreadores lipídicos contendo vermelho de Nilo ..... 110

**Table 2.** Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos contendo vermelho de nilo ..... 114



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise da variância

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLN – carreados lipídicos nanoestruturados

CLSM – confocal laser scanning microscopy

CO – castor oil

COX – ciclooxigenase

DP – desvio padrão

DPPH – difenilpicrilhidrazil

DPR – desvio padrão relativo

EE – eficiência de encapsulação

GSH – glutadiona

HEC – hidroxietilcelulose

HPLC – high performance liquide chromatography

HP- $\beta$ -CD - hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

ICH – International Conference on Harmonization

IP – índice de polidispersão

$J$ - fluxo

$K_p$  – coeficiente de permeabilidade

$L$  – tempo de latência

LAAs- lipoesferas acusticamente ativas

LD – limite de detecção

LDL – low density lipoproteins

LQ – limite de quantificação

MCT – triglicerídeos de cadeia média

MCVL – microscopia confocal de varredura laser

ME – microemulsão

ME<sub>b</sub> – microemulsão branca

ME<sub>rv</sub> – microemulsão contendo resveratrol

MEV-FEG – Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo

ME<sub>VN</sub> – microemulsão contendo vermelho de nilo

mPEG – metoxipolietilenoglicol

NE – nanoemulsão

NE<sub>b</sub> – nanoemulsão branca

NE<sub>rv</sub> – nanoemulsão contendo resveratrol

NE<sub>VN</sub> – nanoemulsão contendo vermelho de nilo

NF-κB – fator nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

NR – nilo red

NLS – nanopartícula lipídica sólida

NLS<sub>b</sub> – nanopartícula lipídica sólida branca

NLS<sub>rv</sub> – nanopartícula lipídica sólida contendo resveratrol

NLS<sub>VN</sub> – nanopartícula lipídica sólida contendo vermelho de nilo

OR – óleo de rícino

PCL- policaprolactona

PEG – polietilenoglicol

PI- polydispersity index

PM – peso molecular

RSD – relative standard deviation

RV – resveratrol

RV-ME – resveratrol loaded- microemulsion

RV-NE – resveratrol loaded-nanoemulsion

RV-SLN – resveratrol loaded-solid lipid nanoparticle

SD – standard deviation

SLN – solid lipid nanoparticle

TS – triestearina

VHS – vírus da herpes simples

VN – vermelho de nilo

$\beta$ -CD –  $\beta$ -ciclodextrina



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
<b>1. RESVERATROL.....</b>	<b>11</b>
1.1 Generalidades.....	11
1.2 Propriedades biológicas.....	12
1.3 Propriedades biológicas do resveratrol na pele.....	14
1.4 Propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade.....	16
1.5 Toxicidade.....	17
<b>2. PELE.....</b>	<b>19</b>
2.1 Anatomia e fisiologia.....	19
2.2 Transporte de fármacos através da pele.....	21
2.3 Estudos de permeação cutânea.....	25
2.4 Estratégias para melhorar a passagem de fármacos através da pele.....	27
<b>3. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA.....</b>	<b>29</b>
3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	29
3.2. Nanoemulsões.....	32
3.3. Microemulsões.....	36
3.4 Sistemas de liberação contendo resveratrol.....	39
<b>CAPÍTULO 2: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÕES COLOIDAIS DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO RESVERATROL DESTINADOS À ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA.....</b>	<b>43</b>

<b>CAPÍTULO 3: SKIN PENETRATION STUDIES OF RESVERATROL INCORPORATED INTO LIPID-BASED NANOCARRIERS.....</b>	<b>75</b>
--	-----------

<b>CAPÍTULO 4: INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TIPO DE NANOCARREADOR LIPÍDICO SOBRE A PENETRAÇÃO CUTÂNEA DO VERMELHO DE NILO USANDO MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREADURA A LASER.....</b>	<b>101</b>
---	------------

<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>121</b>
-----------------------------	------------

<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>127</b>
------------------------	------------

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>133</b>
-------------------------	------------

---

## INTRODUÇÃO GERAL

---





Substâncias polifenólicas constituem um dos maiores e mais onipresentes grupos de compostos fitoquímicos, formados para proteger as plantas do estresse fotossintético, espécies reativas de oxigênio, e plantas herbívoras. Estes compostos são classificados quimicamente em ácido fenólicos e análogos, estilbenos, flavonóides e um quarto grupo que inclui as cumarinas, lignanos e taninos (FRESCO et al., 2006). Atual interesse tem se concentrado sobre os efeitos benéficos na saúde com a dieta de polifenóis, visto que tais compostos exercem inúmeros efeitos biológicos e farmacológicos, os quais têm sido frequentemente associados a sua capacidade de agir como antioxidante. (HARWOOD et al., 2007; LAMBERT et al., 2005).

O resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina presente numa grande variedade de espécies vegetais, incluindo amoras, amendoim e uvas, e, portanto, é um constituinte da dieta humana. Este composto, tal como outros membros da família do estilbeno, é produzido nos vegetais em resposta ao ataque de patógenos, à radiação ultravioleta e à exposição ao ozônio (IGNATOWICZ & BAER-DUBOWSKA, 2001; BURNS et al., 2002). Vários estudos têm destacado e comprovado os benefícios do resveratrol à saúde. Este composto vem apresentando diversas atividades farmacológicas, com claro efeito benéfico em uma série de doenças que, atualmente, exercem um grande impacto na população mundial. Entre algumas das atividades relatadas na literatura podemos citar seu efeito antitumoral, antiviral, antimicrobiano, antioxidante, cardioprotetor e anti-inflamatório, entre outros (GOSWAMI & DAS, 2009).

Apesar dos numerosos estudos sobre as propriedades dos compostos polifenólicos *in vitro*, estes efeitos frequentemente não são observados *in vivo*. A aparente discrepância entre estudos *in vitro* e *in vivo* pode ser parcialmente atribuível à baixa absorção e elevado metabolismo destes compostos (WILLIAMSON & MANACH, 2005). Numerosos estudos em animais e humanos demonstraram que a biodisponibilidade do resveratrol é muito baixa, em decorrência do seu rápido e extenso metabolismo pré-sistêmico, resultando na presença de somente traços da molécula não modificada na circulação sistêmica (WALLE et al., 2004; WENZEL & SOMOZA, 2005). Outros fatores que limitam o aproveitamento terapêutico do resveratrol incluem a sua baixa estabilidade frente à oxidação e baixa solubilidade aquosa (PIÑEIRO, PALMA & BARROSO, 2006).

Inúmeros estudos relatam os benefícios do resveratrol sobre a pele, fazendo com que a liberação tópica deste composto constitua uma interessante alternativa à administração oral para o tratamento de várias desordens cutâneas. O resveratrol tem demonstrado fortes propriedades antiproliferativas e quimiopreventivas contra a carcinogênese (JANG & PEZZUTO, 1998; SOLEAS et al., 2002; AZIZ et al., 2005), proteção contra os danos causados pela radiação ultravioleta, e atividade antimicrobiana contra dermatófitos e ao vírus Herpes simplex (CHAN, 2002; AFAQ, ADHAMI & AHMAD, 2003; DOCHERTY et al., 2004; AZIZ, AFAQ & AHMAD, 2005). Apesar de os estudos de permeabilidade cutânea ter sido promissores, nenhuma evidência foi encontrada quanto à obtenção de concentrações terapêuticas deste fármaco na pele, sugerindo que outros sistemas de liberação possam ser testados com o intuito de potencializar a permeação cutânea e obter preparações eficazes para o tratamento de desordens cutâneas (HUNG et al., 2008).

Embora o tratamento tópico apresente vantagens irrefutáveis, a adequada penetração cutânea de compostos ativos para produzir uma resposta terapêutica ainda é um grande desafio no desenvolvimento destes medicamentos. A camada córnea age como a principal barreira protetora, tanto para a excessiva perda de água, quanto para danos provocados por agentes externos, restringindo a penetração de fármacos através da pele (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007). Assim, esforços têm sido realizados na busca do aumento da penetração de fármacos, visando efeitos locais ou sistêmicos. Diferentes estratégias têm sido realizadas, no intuito de aumentar a biodisponibilidade dos fármacos administrados pela via cutânea. Recentemente, o uso de sistemas nanoestruturados em produtos cosméticos e dermatológicos não somente tem conduzido ao aumento da penetração cutânea de fármacos, mas também permitido a vetorização em subestruturas da pele. Tais sistemas são caracterizados por apresentar tamanho variando entre 1 ( $\mu\text{m}$ ) até algumas centenas de nanômetros, e uma grande área superficial, o que os torna adequados para importantes aplicações farmacêuticas e cosméticas. Além de permitir o direcionamento do fármaco ao local de ação, esses carreadores apresentam algumas vantagens para aplicação tópica, como produção de concentrações elevadas do fármaco nos tecidos, e obtenção de perfis de liberação sustentados, os quais são importantes para suprir a pele com o agente ativo durante um período prolongado (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).

Entre os sistemas nanoestruturados com potencial aplicação tópica destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas, as nanoemulsões e as microemulsões. Estes sistemas nanoestruturados são constituídos por triglicerídeos altamente purificados e misturas complexas de glicerídeos apresentando tamanho entre 10 e 200 nm. Suas principais características incluem a excelente estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis frente à degradação, capacidade de controle da liberação, excelente tolerabilidade, possibilidade de vetorização, além de não apresentar problemas relacionados à produção em grande escala e à esterilização (WANG, SUN & ZHANG, 2002; WISSING, KAYSER & MÜLLER, 2004; MANJUNATH, REDDY & VENKATESWARLU, 2005).

Vários mecanismos têm sido descritos para explicar o aumento da penetração cutânea por meio da administração tópica de carreadores lipídicos nanoestruturados. Microemulsões são, de forma geral, definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água. As microemulsões podem interagir com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica do mesmo. Dessa forma, os lipídios passam de uma forma cristalina ordenada para uma forma líquida desordenada, a permeabilidade cutânea é aumentada e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através dessa barreira, fica bastante facilitada. As nanopartículas lipídicas sólidas e as nanoemulsões são dispersões coloidais opalescentes, constituídas de lipídeos sólidos e líquidos a temperatura ambiente, respectivamente. A aplicação de dispersões de nanopartículas lipídicas induz a mudanças estruturais das partículas. Após a evaporação da água, a matriz lipídica torna-se mais ordenada, provocando a expulsão do fármaco encapsulado e a formação de uma solução supersaturada do mesmo sobre a pele, aumentando assim a absorção. O tamanho reduzido das partículas também permite o estreito contato com as junções superficiais dos corneócitos, favorecendo o acúmulo das partículas e sustentação da liberação do agente ativo (GEVE, 2004; SANNA et al., 2007). Além disso, o efeito oclusivo proporcionado pelo filme lipídico hidrata a camada córnea e favorece a absorção (WISSING & MULLER, 2003; POPLE & SINGH, 2006; ALVES, 2007).

Tendo em vista o potencial benefício do uso tópico do resveratrol, a sua encapsulação em sistemas de liberação

nanoestruturados lipídicos foi realizada. Nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões foram preparadas e avaliadas quanto à capacidade de incorporar este composto polifenólico. A capacidade destes diferentes carreadores lipídicos em liberar o resveratrol através da pele foi avaliada e comparada.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Desenvolver sistemas nanoestruturados lipídicos contendo o polifenol resveratrol, visando o aumento da penetração cutânea e o aproveitamento do potencial terapêutico deste composto no tratamento de desordens cutâneas.

### Objetivos específicos:

- Preparar nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões contendo resveratrol variando o tipo de lipídeo e a concentração de tensoativo;
- Caracterizar as nanoestruturas lipídicas contendo o resveratrol quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação e teor de fármaco;
- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para quantificação do resveratrol nos nanocarreadores lipídicos desenvolvidos e nos estudos de penetração cutânea;
- Preparar e caracterizar hidrogéis a partir das dispersões nanocarreadoras lipídicas contendo o resveratrol;
- Avaliar e comparar o perfil de permeação cutânea *in vitro* do resveratrol nanoencapsulado, antes e após a incorporação em

hidrogéis, utilizando células de difusão tipo Franz e pele de orelha de porco como modelo de membrana;

- Preparar nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões contendo o marcador fluorescente vermelho de Nilo e caracterizar quanto ao tamanho, potencial zeta, teor e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a penetração cutânea dos sistemas lipídicos nanoestruturados contendo o vermelho de Nilo por meio de microscopia confocal de varredura a laser.
- Comparar os diferentes sistemas nanoestruturados lipídicos quanto à capacidade de liberar o resveratrol através da pele.

---

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---





## 1. RESVERATROL

### 1.1 Generalidades

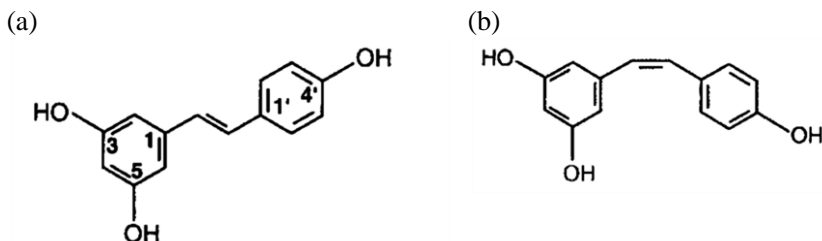
Substâncias polifenólicas constituem um dos maiores e mais onipresentes grupos de compostos fitoquímicos, formados para proteger plantas do estresse fotossintético, espécies reativas de oxigênio e plantas herbívoras. Milhares de moléculas apresentam estrutura polifenólica, ou seja, várias hidroxilas ligadas diretamente a anéis aromáticos. Estes compostos podem ser classificados em diferentes grupos em função do número de grupamentos fenólicos e dos elementos estruturais que ligam estes anéis um ao outro. Distinguem-se então em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos (MANACH et al., 2004).

Os estilbenos constituem um grupo de polifenóis amplamente distribuídos no reino vegetal, embora a sua presença na dieta seja muito pequena. Entre eles, o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é, de longe, o composto mais relevante, sendo encontrado sobretudo no vinho tinto, na forma de aglicona (0,3 – 7 mg/L) e glicosídica (15 mg/L) (MANACH et al., 2004). Foi primeiramente isolado de raízes do heléboro (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) em 1940 e mais tarde, em 1963, das raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa, popularmente conhecida como Ko-kon-jo. Em 1977, o resveratrol foi detectado em videiras (*Vitis vinifera*) por Langcake, que

descobriu que o composto era sintetizado pelas folhas em resposta à infecção por fungos ou exposição à radiação ultravioleta. Inicialmente caracterizado como uma fitoalexina, o resveratrol despertou pouco interesse até 1992, quando foi postulado que ele seria o responsável pelos efeitos cardioprotetores do vinho tinto (BAUR & SINCLAIR, 2006; DAS & MAULIK, 2006; ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2008). Entretanto foi somente após o potencial anticarcinogênico deste composto ter sido evidenciado que o número de relatos científicos aumentou consideravelmente.

O resveratrol existe nas formas isoméricas *cis*- e *trans*- (Figura 1), apesar da forma *cis*- nunca ter sido encontrada na uva. O *trans*-resveratrol é obtido sinteticamente e encontra-se disponível comercialmente; a forma *cis*- pode ser obtida por irradiação ultravioleta.

Ensaios conduzidos sobre várias condições mostraram que o *trans*-resveratrol permanece estável por vários meses quando completamente protegido da luz, exceto em altos valores de pH (FRÉMONT, 2000).



**Figura 1.** Estrutura química dos isômeros (a) *trans*-resveratrol e (b) *cis*-resveratrol.

## 1.2 Propriedades biológicas

Inúmeras revisões têm destacado as propriedades farmacológicas do resveratrol (FRÉMONT, 2000; GUSMAN, MALONNE & ATASSI, 2001; PERVAIZ, 2004; BAUR & SINCLAIR, 2006; DAS & MAULIK, 2006; FULDA & DEBATIN, 2006; SHANKAR, SINGH & SRIVASTAVA, 2007; GOSWAMI & DAS, 2009). Esta fitoalexina mostrou estar envolvida em diversos processos fisiológicos e bioquímicos, os quais resultam em várias atividades biológicas (Tabela 1). O resveratrol tem demonstrado agir nos três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão do tumor. Em estudos *in vitro* e *in vivo*, o resveratrol mostrou ser capaz de modular vários alvos e rotas de sinalização envolvidas no crescimento celular, apoptose e inflamação. As causas e o desenvolvimento de malignidades também envolvem a geração de espécies oxidativas de oxigênio, capazes de danificar os principais componentes das células. O resveratrol inibe as prostaglandinas e a formação de óxido nítrico e, portanto, os seus efeitos anticarcinogênicos parecem estar intimamente relacionados com sua atividade antioxidante, através da inibição das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), do complexo citocromo P450 e induzindo a quinona redutase. O resveratrol pode

inibir simultaneamente a bioativação pró-mutagênica, estimular a detoxificação carcinogênica e prevenir o organismo contra os efeitos adversos dos diversos agentes tóxicos ambientais. Além disso, ele demonstrou inibir a enzima hidroxiperoxidase, proteína quinase C, a fosforilação da Bcl-2, proteína quinase B (PKB ou Akt), quinase de adesão focal, NF- $\kappa$ B, metaloprotease de matriz tipo 9, e reguladores do ciclo celular. O resveratrol também demonstrou atividade inibitória da angiogênese e metástase (FRÉMONT, 2000; GUSMAN, MALONNE & ATASSI, 2001; SURH, 2003; ATHAR et al., 2007).

**TABELA 1:** Atividades biológicas do resveratrol.

<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
Antitumoral	GAUTAM et al., 2000; ASENSI et al., 2002; LI et al., 2010
Cardioprotetora	DAS & MAULIK, 2006; OPIE & LECOUR, 2007
Antifúngica	JUNG, SEU & LI, 2007; CHAN et al., 2002
Antiinflamatória	MARTÍN et al., 2006
Antiplaquetária	OLAS & WACHOWICZ, 2005
Antioxidante	FUHRMAN, LAVY & AVIRAM, 1995; RASTIJA & MEDIC-SARIC, 2009
Antiangiogênica	HU et al., 2007
Desordens respiratórias	LEE et al., 2009
Antimicrobiana	CHAN et al., 2002
Antiviral	DOCHERTY et al., 1999; DOCHERTY et al., 2004
Aumento de sobrevida	BAUR et al., 2006; KAEBERLEIN & RABINOVITCH, 2006

Acredita-se que o resveratrol seja responsável pelo então chamado “paradoxo Francês”, em que o consumo de vinho tinto tem conduzido à redução da taxa de mortalidade por doenças cardíacas. De fato, o vinho e extratos de uva demonstraram reduzir a agregação plaquetária, promover o vasorelaxamento, suprimir a aterosclerose, reduzir a peroxidação lipídica e melhorar as concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol. A descoberta de que o vinho é a principal fonte de resveratrol na dieta tem impulsionado as pesquisas para explicar estes efeitos cardioprotetores (BAUR & SINCLAIR, 2006; DAS & MAULIK, 2006).

É reconhecido que as propriedades cardioprotetoras do resveratrol são atribuídas, em parte, as propriedades anti-inflamatórias, como a inibição da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, modificação da síntese de eicosanóides, inibição da atividade de algumas células imunes, ou inibição de enzimas, como a COX-1 e COX-2, as quais são responsáveis pela síntese de mediadores pró-inflamatórios por meio do efeito inibitório do resveratrol nos fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NF-κB) ou proteína ativadora-1 (AP-1) (DAS & DAS, 2007).

Em países com alto consumo de substâncias fitoestrogênicas, como as isoflavonas derivadas de soja, o desenvolvimento de osteoporose, sintomas da menopausa, câncer de mama e próstata é relativamente raro. O resveratrol também é considerado um fitoestrógeno, devido à sua semelhança estrutural com um estrógeno sintético, o dietilestilbestrol. Em células de câncer de mama humano MCF-7 estrogênio-positivo, o *trans*-resveratrol inibiu competitivamente a ligação do [<sup>3</sup>H]-estradiol a receptores de estrogênio do tipo 1, ativando-os. Esta capacidade de antagonizar a ligação do estrogênio é a razão para o possível uso do *trans*-resveratrol na prevenção ou tratamento de câncer de mama (BURNS et al., 2002).

### 1.3 Propriedades biológicas do resveratrol na pele

Além dos diversos efeitos biológicos descritos anteriormente, cabe ressaltar seus efeitos após administração tópica, uma vez que a liberação deste composto na pele parece ser uma alternativa interessante à administração oral, para o tratamento de várias desordens cutâneas.

Chan e colaboradores (2002) avaliaram a atividade antimicrobiana do resveratrol em cultura de células, contra bactérias e dermatófitos, os quais são os principais agentes etiológicos de infecções cutâneas. O crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* foi inibido por 171-342 µg/mL de resveratrol dissolvido em dimetilsulfóxido. Igualmente, o crescimento de dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypsum* foi inibido por 25-50 µg/mL de resveratrol. Tais resultados indicaram o potencial uso do resveratrol no combate de patógenos humanos que infectam a pele.

Estudos anteriores demonstraram que o resveratrol possui atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra o vírus do herpes simples (VHS) (DOCHERTY et al., 1999; DOCHERTY et al., 2004). Após administração tópica de um creme a 12,5 ou 25% em camundongos SKH1 infectados com o vírus VHS-1, o resveratrol suprimiu o desenvolvimento da lesão de modo dependente do regime de aplicação do creme e da sua concentração na formulação. Estudos comparativos entre creme de resveratrol, creme de docosanol 10% (Abreva<sup>TM</sup>) e pomada aciclovir 5% (Zovirax<sup>TM</sup>) também foram realizados. Neste estudo, o aciclovir e o resveratrol exibiram eficácias similares contra o VHS-1, enquanto que os animais que foram topicamente tratados com docosanol não foram protegidos e desenvolveram lesões semelhantes ao do grupo controle (apenas o creme). O creme contendo resveratrol também foi capaz de suprimir, de modo efetivo, o desenvolvimento da lesão causada pelo VHS-1 aciclovir-resistente.

Jang e Pessuto (1998) sugeriram que o resveratrol inibe a tumorigênese na pele de ratos por alterar numerosas alterações bioquímicas, como a geração do estresse oxidativo e indução da expressão gênica, e, possivelmente, modula a expressão da *c-fos*, uma proteína codificada por um protooncogene, assim como do fator de crescimento  $\beta$ 1. Em outro estudo, o resveratrol inibiu a proliferação celular de células HaCaT, o dano na sua ultraestrutura e a oxidação provocados pela irradiação de UVA de modo dose-dependente. Isto ocorre provavelmente pela sua capacidade de aumentar a atividade da oxidase e eliminar oxiradicais (MING-LIANG et al., 2006).

Alguns autores demonstraram que o resveratrol oferece proteção substancial contra os danos causados pela exposição à radiação

UVB, por intermédio de suas propriedades antioxidantes. Os efeitos quimiopreventivos proporcionados pelo resveratrol na pele foram relacionados à inibição da survivina, um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose, e dos eventos associados a este efeito (AZIZ, AFAQ & AHMAD, 2005). Uma significativa inibição na incidência do tumor e um atraso no início da tumorigênese foram evidenciados em animais que receberam tratamento tópico com resveratrol (25 ou 50  $\mu\text{M}$ ) antes ou após a exposição à radiação ultravioleta (AZIZ et al., 2005). Com base nestes trabalhos, os autores propuseram que é possível formular produtos cosméticos como protetores solares ou outros produtos de uso tópico contendo resveratrol, com vistas à prevenção do câncer de pele e de outras condições, que podem ser causados pela radiação UV.

#### 1.4 Propriedades farmacocinéticas e biodisponibilidade

Apesar dos numerosos estudos sobre as propriedades dos compostos polifenólicos *in vitro*, estes efeitos freqüentemente não são observados *in vivo*. A aparente discrepância entre estudos *in vitro* e *in vivo* pode ser parcialmente atribuível à baixa absorção e elevado metabolismo destes compostos (WILLIAMSON & MANACH, 2005). A biodisponibilidade de um nutriente é definida pelo grau em que ela se torna disponível para o tecido alvo após a administração. Assim, o conhecimento da absorção, distribuição, e metabolismo de um composto *in vivo* é a condição prévia para determinar a sua biodisponibilidade (WENZEL & SOMOZA, 2005).

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de fornecer informações sobre a absorção, metabolismo e conseqüente biodisponibilidade do resveratrol. Walle e colaboradores (2004) compararam a biodisponibilidade do  $^{14}\text{C}$ -resveratrol, após administração oral e intravenosa em humanos. Após a administração de uma única dose oral de 25 mg, pelo menos 70% do resveratrol foi absorvido, alcançando uma concentração máxima de  $491 \pm 90 \mu\text{g/mL}$ , com um tempo de meia vida plasmática de  $9,2 \pm 0,6$  horas. Entretanto, unicamente traços da sua forma inalterada ( $< 5 \text{ ng/mL}$ ) foram detectados no plasma. A maior parte da dose oral foi recuperada na urina. A análise por CLAE acoplada à espectroscopia de massa identificou três rotas metabólicas para este fármaco: conjugação dos grupos fenólicos com

ácido glucurônico e sulfato e, curiosamente, a hidrogenação da ligação dupla alifática, esta última provavelmente produzida pela microflora intestinal. A extremamente rápida conjugação com sulfato no fígado e intestino pareceu ser decisiva na biodisponibilidade do resveratrol, após administração oral.

Experimentos indicaram que o *trans*-resveratrol-3-O-glucuronídeo é o principal metabólito do resveratrol produzido pelo fígado humano, enquanto tanto o *trans*-resveratrol-3-O-glucuronídeo e *trans*-resveratrol-3-sulfato foram encontrados na urina e soro de rato. Além disso, o resveratrol foi encontrado predominantemente na sua forma conjugada na circulação sistêmica, e não na sua forma livre. Apenas vestígios de *cis*-resveratrol foram detectados, indicando que isomerização não é um fator importante para o metabolismo e eliminação do resveratrol (YU et al., 2002).

Recentes estudos farmacocinéticos foram realizados em 11 voluntários saudáveis, os quais receberam três diferentes produtos da uva: vinho tinto (250 mL), suco de uva (1 L) ou comprimidos constituídos de extratos de vinho tinto enriquecidos com *trans*-resveratrol. *Cis*-resveratrol, *trans*-resveratrol e dihidroresveratrol foram determinados no plasma e na urina. Entretanto, as formas livres destes compostos fenólicos não foram detectadas. Apesar de doses similares de *trans*-resveratrol terem sido administradas, a biodisponibilidade a partir do vinho e suco de uva foi seis vezes maior do que a obtida após a ingestão dos comprimidos. Este estudo mostrou que o resveratrol é mais bem absorvido a partir de produtos naturais da uva do que de comprimidos, ressaltando a importância da matriz na sua disponibilidade biológica (ORTUÑO et al., 2010).

## 1.5 Toxicidade

A maioria dos estudos descreve a ausência de toxicidade após administração do resveratrol. Juan e colaboradores (2002) não encontraram efeitos adversos em ratos, após o consumo de uma quantidade de resveratrol equivalente a 1000 vezes ao conteúdo encontrado no vinho tinto. Da mesma forma, Crowell e colaboradores (2004) não observaram toxicidade renal em ratos alimentados com uma dose de 300 mg/kg/dia de resveratrol por 4 semanas. Em um outro estudo, os autores descreveram a ausência de oncogenicidade em camundongos em uma dose de 4 g de resveratrol/kg/dia por 28 dias. No

entanto, esta dose causou uma leve anemia e aumento do peso do fígado e do colesterol sérico (HORN et al., 2007). A administração de uma única dose oral de 1,0, 2,5 e 5,0 g não produziu efeitos adversos sérios (BOOCOOCK et al., 2006).

Por outro lado, resultados encontrados por Radkar e colaboradores (2007) indicam que o resveratrol é tóxico para cultura de macrófagos, células T e células da pele em concentrações  $\geq 25 \mu\text{mol/L}$ , e que a citotoxicidade ocorre através de um mecanismo que não envolve estresse oxidativo.

Estudos recentes conduzidos com *trans*-resveratrol de alta pureza (Resvida<sup>TM</sup>), mostraram que este fármaco não foi irritante ou sensibilizante para a pele e olhos. Este composto não produziu mutações em ensaio de mutação reversa bacteriana em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, embora tenha produzido atividade clastogênica em um teste de aberração cromossômica em linfócitos humanos. O resveratrol igualmente não demonstrou genotoxicidade nos testes de micronúcleo em medula óssea *in vitro* e *in vivo* e efeito reprodutivo adverso em um estudo de toxicidade embrio-fetal *in vivo* nas doses de 750 mg/Kg/dia (WILLIAMS et al., 2009).



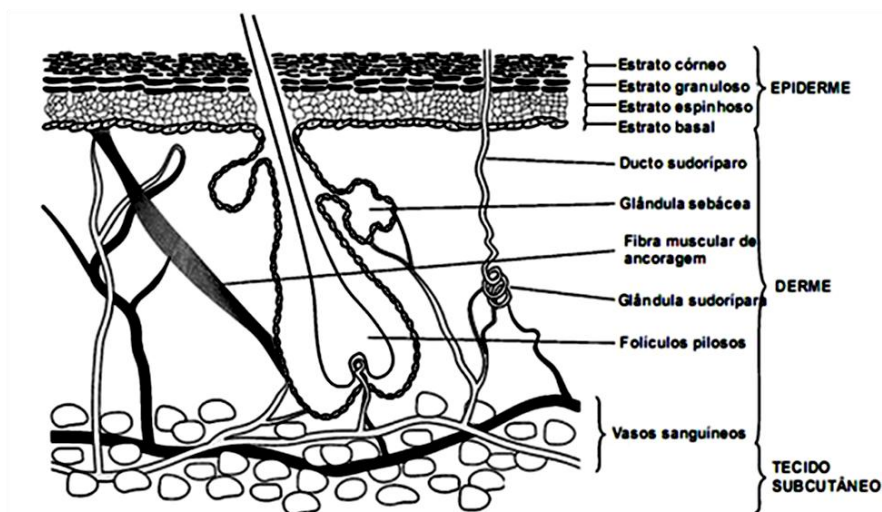
## 2. PELE

### 2.1 Anatomia e fisiologia

A pele é o maior órgão do corpo, e talvez o mais complexo, recobrendo uma área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup> que faz o contato entre nosso corpo e o ambiente externo. Ela impede a perda de água e a entrada de materiais estranhos. Em termos do número de funções desempenhadas, a pele simplesmente se sobrepõe a qualquer outro órgão; a sua principal função é a proteção física, química, imunológica, e a defesa contra patógenos, radiação UV e radicais livres. Ela também é importante na termorregulação, funciona como um órgão sensorial (dor, tato, percepção de temperatura), e executa funções do sistema endócrino (síntese de vitamina D, conversão periférica de pró-hormônios e características sexuais secundárias, produção de feromônio) (HADCRAFT, 2001; MENON, 2002).

A pele é composta basicamente por duas camadas principais (Figura 2). A derme, com 1-2 mm de espessura, é a camada mais profunda, diretamente adjacente à epiderme e fornece o suporte mecânico para a pele. É constituída por elementos do tecido conjuntivo, composto por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais, água, além de fibroblastos. Além disso, é extensivamente vascularizada e apresenta unidades pilosebáceas e glândulas sudoríparas. A epiderme possui em torno de 100 – 150 µm de espessura, sendo formada por várias camadas de células: o estrato germinativo (camada basal), estrato espinhoso (camada espinhosa), estrato granuloso (camada granular) e estrato córneo. Cada camada é definida pela posição, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos. As células tornam-se queratinizadas à medida que migram para a superfície. A epiderme encontra-se em constante auto-renovação, o qual é um processo dinâmico em que a perda das células da superfície do estrato córneo (descamação) é compensada pelo crescimento das células na epiderme inferior. Considerando-se que a epiderme não apresenta vasos sanguíneos, os nutrientes devem se difundir da derme para a epiderme, para garantir a viabilidade da mesma. Cerca de 95% da epiderme é constituída por queratinócitos e, em menor proporção, por melanócitos, células de Langerhans e células

de Merkel (mecanorreceptores). (MENON, 2002; BOUWSTRA et al., 2003; EL MAGHRABY, BARRY & WILLIAMS, 2008).



**Figura 2.** Representação da pele humana mostrando as diferentes camadas e apêndices. Fonte: Adaptado de EL MAGHRABY, BARRY & WILLIAMS (2008).

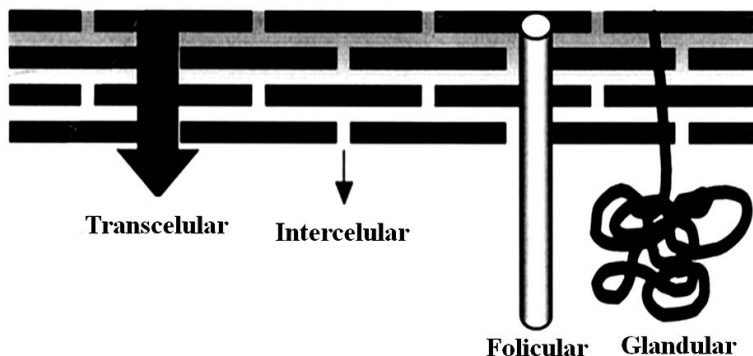
O estrato germinativo é formado por uma única camada de células colunares basais, que se mantêm ligadas à membrana basal por meio de hemidesmossomos. Ele é composto de células-tronco epidérmicas, ampliando células derivadas delas. O estrato espinhoso recebe esse nome devido à grande quantidade de desmossomos, conferindo assim um aspecto espinhoso a essas células. As células do estrato granuloso são mais achatadas, contendo grânulos de queratohialina, adquirindo uma maior concentração de queratina nas camadas mais superiores. Por fim, a camada mais superficial, o estrato córneo, é composta de corneócitos (queratinócito terminal diferenciado), células mortas (anucleadas), alongadas e planas (MENON, 2002). Constitui-se de uma camada heterogênea que contém cerca de 50% ceramidas, 10–20% de ácidos graxos e em torno de 25% de colesterol (HARDING, 2004). Normalmente apresenta em torno de 18 a 21 camadas celulares, e podem diferir em sua espessura, filamentos de queratina, número de

desmossomos (corneodesmossomos), dependendo do local do corpo e da sua localização dentro do estrato córneo (MENON, 2002).

Os corneócitos estão localizados em uma matriz intercelular constituída por bicamadas lipídicas contendo ácidos graxos, ceramidas, fosfolipídeos, triglicerídeos e colesterol (HARDING, 2004). Sendo assim, regiões hidrofílicas e lipofílicas podem ser encontradas no interior desta matriz, constituindo meios de difusão de naturezas opostas, o que torna o estrato córneo o principal obstáculo à administração tópica de medicamentos (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002). Em relação aos fenômenos de transporte, as moléculas são transferidas do meio externo para o estrato córneo através de difusão passiva, sem gasto energético. Não há ocorrência de transporte ativo e nem de outra modalidade de transporte mediado por carreadores/proteínas transportadoras nesta camada (AKOMEAH et al, 2004).

## **2.2 Transporte de fármacos através da pele**

A passagem de fármacos a partir da superfície da pele até o tecido subepidermal pode ocorrer por três caminhos potenciais: através de folículos pilosos associados com as glândulas sebáceas, por meio de dutos sudoríparos, ou através do estrato córneo contínuo existente entre esses apêndices, passando através das células (transporte transcelular) ou por entre as células (transporte intercelular) (Figura 4). Entretanto, área dos apêndices disponível para o transporte é de apenas 0,1%, contribuindo de forma pouco significativa para o alcance do estado estacionário do fluxo de fármacos. Esta rota parece ser importante no transporte de íons e moléculas polares que tem dificuldade em cruzar o estrato córneo intacto (BARRY, 2001; SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).



**Figura 3.** Representação esquemática da pele mostrando as possíveis rotas de Penetração. Fonte: HADGRAFT (2001).

Assim, embora os folículos pilosos possam, por princípio, permitir o acesso direto de compostos até as regiões mais profundas da pele e os vasos sanguíneos, a maior parte das substâncias ativas penetra e permeia a pele através da camada córnea, usando a rota intercelular tortuosa existente entre os corneócitos (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007). A extensão de caminho difusional é, portanto, muito maior do que a espessura do estrato córneo (~20  $\mu\text{m}$ ) e tem sido estimada, em torno de 500  $\mu\text{m}$ . Os espaços intercelulares contêm lipídeos estruturados, sendo que as moléculas necessitam atravessar uma grande variedade de domínios lipofílicos e hidrofílicos, antes de atingir a junção entre o estrato córneo e a epiderme viável (HADGRAFT, 2004). Portanto, a absorção cutânea depende das características físico-químicas dos compostos e da região aplicada. Para ser bem absorvido, a substância deve apresentar massa molar menor que 0,6 kDa e adequado coeficiente de partição óleo/água. Além disso, as substâncias aplicadas devem-se apresentar na forma de sistemas saturados ou supersaturados (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).

Outros fatores que afetam a penetração cutânea de fármacos incluem o grau de hidratação e o pH. O aumento da hidratação do estrato córneo diminui a resistência do mesmo, aumentando a permeação de fármacos, provavelmente por provocar um

intumescimento das estruturas compactas da camada cornificada e a criação de canais aquosos que permitem a difusão dos mesmos. Sabe-se que o pH afeta o grau de ionização das moléculas e, embora apenas moléculas não ionizadas passem prontamente através das membranas lipídicas, sabe-se que moléculas ionizadas penetram no estrato córneo até um determinado nível. Uma vez que estas moléculas apresentam maior concentração do que as neutras quando em solução saturada ou próxima da saturação, elas acabam exercendo uma contribuição significativa para o fluxo total (AULTON, 2005).

Assim, para que um fármaco aplicado topicamente possa exercer um efeito terapêutico local ou sistêmico, é preciso que seja capaz de atravessar o estrato córneo. A primeira lei de Fick fornece a equação mais básica da difusão, na qual relaciona o fluxo ao gradiente de concentração:

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D \times K \times \Delta C}{h} \quad \text{Equação 1}$$

onde  $J$  é o fluxo por unidade de área no estado estacionário,  $m$  é a massa,  $t$  o tempo,  $D$  é o coeficiente de difusão na pele,  $K$  é o coeficiente de partição do fármaco entre a pele e veículo,  $\Delta C$  é o gradiente de concentração do fármaco entre o veículo e a pele e  $h$  é o comprimento da rota difusional através da pele.

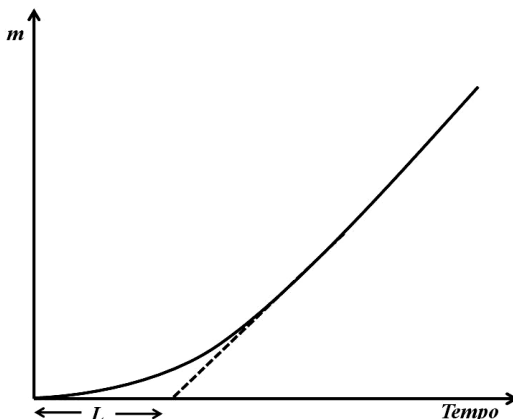
Se medirmos a massa de difusante acumulada,  $m$ , que passa por unidade de área pela membrana em função do tempo, obteremos o gráfico apresentado na Figura 4. A tempos maiores, o gráfico aproxima-se de uma linha reta, e de sua inclinação obtém-se a constante de fluxo  $dm/dt$  conforme observado na Equação 1. Se a linha do estado estacionário é extrapolada até o eixo do tempo, o intercepto assim obtido, para  $m = 0$ , é o tempo de latência (*lag time*) ( $L$ ).

Considerando que em circunstâncias normais a concentração de fármaco aplicada na superfície da pele é muito maior do que a permeada, a equação (1) pode ser simplificada para:

$$J = K_p \times C_0 \quad \text{Equação 2}$$

onde  $K_p$  é o coeficiente de permeabilidade ( $= KD/h$ ) ( $\text{cm.h}^{-1}$ ) e  $C_0$  é a concentração de fármaco aplicada na pele. Como se pode observar, muitas vezes é difícil separar  $K$  e  $D$ , e sua magnitude calculada

dependerá de  $h$ . No entanto,  $h$  não pode ser estimado com precisão, pois depende da tortuosidade dos canais intercelulares que é imprecisa.



**Figura 4.** Absorção em função do tempo, para o caso simples de ordem zero, obtido pelo gráfico de  $m$ , a quantidade cumulativa de difusante atravessando uma unidade de área de membrana. O estado estacionário é alcançado quando o gráfico se torna linear. A extrapolação da porção linear até o eixo do tempo gera o valor do tempo de latência ( $L$ ). Fonte: AULTON, (2005).

O coeficiente de permeabilidade pode ser estimado pela equação empírica descrita por Potts & Guy (1992):

$$\text{Log } [kp/(\text{cm h}^{-1})] = -2,7 + 0,71 \log k_{oct} - 0,0061PM \quad \text{Equação 3}$$

onde  $k_{oct}$  é o coeficiente de partição octanol-água e PM é o peso molecular.

O fluxo máximo de um composto ocorre quando  $Co$  é igual à solubilidade do fármaco. Uma análise simples destas equações mostra que as propriedades físico-químicas importantes para a penetração de fármacos através da pele são o coeficiente de partição, coeficiente de difusão e solubilidade. As grandes moléculas tendem a se difundir lentamente, daí o termo PM na Equação 3. Moléculas com boa solubilidade em óleos e água apresentam boa permeabilidade. Estas moléculas tendem a ser compostos com baixo ponto de fusão. As

equações 1 e 3 indicam que um alto coeficiente de partição fornece um alto fluxo, no entanto, grandes valores de  $K$  tendem a produzir moléculas apresentando baixa solubilidade. Em geral, moléculas com um log  $k$  entre 1-3 têm um comportamento de partição ótimo para a difusão (HADGRAFT, 2004).

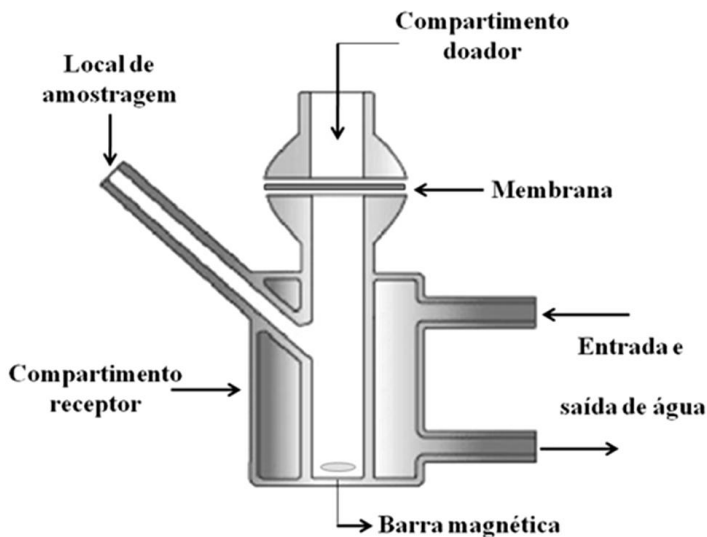
## 2.3 Estudos de permeação cutânea

A verificação da permeação cutânea é uma das principais etapas no delineamento de novas formas farmacêuticas de liberação dérmica ou transdérmica, pois permitem compreender os fatores que determinam o bom desempenho *in vivo*. Certamente, os dados mais confiáveis de absorção através da pele são obtidos de estudos em humanos, no entanto, esses estudos geralmente não são possíveis durante a fase inicial de desenvolvimento de um novo medicamento ou de novos candidatos a fármacos. Visto que é praticamente impossível realizar estudos de permeação cutânea somente em modelos *in vivo*, numerosos modelos *ex vivo* e *in vitro* têm sido freqüentemente empregados para avaliar os parâmetros cinéticos da permeação de fármacos através da pele (GODIN & TOUITOU, 2007).

As técnicas *in vitro* utilizam células de difusão, as quais apresentam dois compartimentos: o receptor, o qual contém um líquido receptor, e o doador. Os dois compartimentos são separados por membrana sintética ou pele. Quando solutos lipofílicos são investigados, modificadores de solubilidade são utilizados com o fluido receptor para promover uma adequada solubilidade e garantir as condições de penetração (BRONAUGH & STEWART, 1984). O modelo de célula de difusão tipo Franz (Figura 5), também chamado de modelo estático, representa uma opção de ampla aplicabilidade para estudos de penetração e permeação (FRANTZ, 1990). O estrato córneo da pele encontra-se voltado para o compartimento doador, enquanto que o tecido conectivo da derme para o receptor (SINKO, 2008).

Apesar das preocupações éticas, o uso de animais ou modelos de pele isolada de animais são freqüentemente relatados para avaliar a absorção percutânea de fármacos. Variações na metodologia usada com um modelo específico de pele, tais como tipo de célula de difusão, temperatura da pele, meio receptor, a dose aplicada e área de difusão,

podem significativamente afetar os resultados. No entanto, os modelos *in vitro* oferecem ferramentas importantes na seleção de formulações, na avaliação das propriedades promotoras da permeação cutânea, nos mecanismos de ação dos carreadores, e na avaliação da permeabilidade cutânea de uma série de fármacos estruturalmente relacionados com potencial aplicação cutânea (GODIN & TOUITOU, 2007).



**Figura 5.** Esquema de célula de difusão tipo Franz. Fonte: Adaptado de [www.keystone-scientific.co.jp/.../franz/FAQ.html](http://www.keystone-scientific.co.jp/.../franz/FAQ.html)

Para avaliar a absorção transdérmica de uma molécula, a membrana mais relevante é a pele humana. Pele de várias fontes, incluindo cirurgia plástica e amputações, tem sido utilizada em estudos de permeação cutânea *in vitro*. Entretanto, sua disponibilidade é limitada e pele animal é, portanto, frequentemente usada. Uma vasta gama de modelos animais tem sido sugerida em substituição à pele humana, incluindo modelos de primatas, suínos, ratos, camundongos, cobaias e cobras. Como o uso de primatas em pesquisa é muito restrito, o modelo animal mais relevante para a pele humana é o porco. Peles de suínos são facilmente obtidas de matadouros e suas propriedades histológicas



e bioquímicas são similares à pele humana, sendo particularmente aceitas para estudos de permeação (WESTER et al., 1998; MUHAMMAD, BROOKS & RIVIERE, 2004; JACOBI et al., 2007). A pele da orelha de suínos é, particularmente, apropriada para estudos de permeação e fornecem resultados comparáveis a pele humana. Estudos examinaram que as espessuras do estrato córneo e da epiderme suína são similares as da pele humana. Além disso, a estrutura folicular e a quantidade de pelos da pele suína também se assemelha a da pele humana, com pelos e infundíbulos que penetram na derme. Ainda, a anatomia vascular e o arranjo das fibras de colágeno na derme, bem como o conteúdo de glicoesfingolipídeos do estrato córneo e ceramidas são semelhantes no homem e no porco doméstico (GODIN & TOUTOU, 2007).

## **2.4 Estratégias para melhorar a passagem de fármacos através da pele**

Embora o tratamento tópico apresente vantagens irrefutáveis, a adequada penetração cutânea de compostos ativos para produzir uma resposta terapêutica ainda é um grande desafio no desenvolvimento destes medicamentos. A camada córnea age como a principal barreira protetora, tanto para a excessiva perda de água, quanto para danos provocados por agentes tóxicos e microorganismos do ambiente. A absorção percutânea de substâncias aplicadas na pele depende grandemente da natureza físico-química do composto e da região da aplicação, entretanto, a aplicação de sistemas de liberação convencionais, tais como cremes e pomadas, resultam na penetração de um percentual muito baixo do fármaco aplicado, o qual ainda varia consideravelmente entre os indivíduos, fazendo com que as quantidades permeadas alcancem unicamente níveis subterapêuticos (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).

Diferentes estratégias têm sido empregadas para contornar as limitações impostas pela baixa absorção percutânea de fármacos. Os promotores de absorção, como por exemplo, etanol, Tween 80, taurocolato de sódio, tem demonstrado ser efetivos. Entretanto, muitos deles induzem ao aparecimento de dermatite irritativa, a qual está de fato associada ao aumento de até 80 vezes na penetração cutânea de substâncias ativas (LASHMAR, HADGRAFT & THOMAS, 1989).

Além dos promotores químicos, técnicas envolvendo processos físicos têm sido testadas com sucesso e incluem: (i) iontoforese, a qual a penetração de compostos químicos com carga através da pele é induzida por meio da aplicação de um campo elétrico; (ii) fonoforese, que consiste na utilização do ultra-som de alta frequência, e (iii) eletroporação, a qual envolve a criação de poros aquosos na bicamada lipídica por meio da aplicação de pulsos elétricos curtos. A formação de pares iônicos e a perfuração da pele com o uso de microagulhas são outras estratégias descritas na literatura que são usadas com o intuito de aumentar a penetração cutânea de fármacos (BARRY, 2001; CHORILLI et al., 2007; BOUNOURE et al., 2008; MARRA et al., 2008; PIRES-DE-CAMPOS et al., 2008; HAQ et al., 2009; LI et al., 2010).

Mais recentemente, o uso de sistemas nanoestruturados em produtos cosméticos e dermatológicos tem conduzido não somente ao aumento da penetração cutânea de fármacos, mas também permitido a vetorização dos mesmos em subestruturas da pele. Tais sistemas são caracterizados por apresentar tamanho variando entre 1 (um) até algumas centenas de nanômetros e, portanto, apresentam uma elevada área superficial, o que os torna promissores carreadores para aplicações farmacêuticas e cosméticas. Um levantamento mais aprofundado do uso de sistemas nanoestruturados visando aplicação tópica cutânea será descrito a seguir.

### **3. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÃO TÓPICA**

Vários tipos de carreadores coloidais têm sido empregados com o objetivo de aumentar a passagem de fármacos através da pele. Estes sistemas diferem entre si em função de sua composição, capacidade de incorporar fármaco e aplicabilidade, mas a característica comum é o tamanho submicrométrico. Além de permitir o direcionamento do fármaco ao local de ação, esses carreadores apresentam algumas vantagens para aplicação tópica, como a produção de concentrações elevadas do fármaco nos tecidos e obtenção de perfis de liberação sustentados, os quais são importantes para suprir a pele com o agente ativo durante um período prolongado (SCHÄFER-HORTING, MEHNERT & KORTING, 2007). Vários materiais poliméricos têm sido empregados na preparação de dispersões coloidais. Entretanto, nas últimas duas décadas, um crescente interesse tem sido dispensado ao desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos para a administração de fármacos que exibem baixa solubilidade aquosa. Suas principais vantagens em relação aos nanocarreadores poliméricos incluem excelente estabilidade física, excelente tolerabilidade e facilidade de escalonamento da produção. Nanocarreadores lipídicos podem ser constituídos de lipídeos sólidos ou líquidos, ou por misturas deles, em várias proporções, e podem ser obtidos por diferentes técnicas. O uso de lipídeos altamente purificados, combinado com tensoativos adequados, pode levar a formação de sistemas matriciais ou reservatórios, exibindo grande faixa de tamanhos de partículas (HAUSS, 2007). Além dos sistemas nanoestruturados lipídicos apresentados a seguir, também surgiram na última década, para superar algumas limitações das nanopartículas sólidas lipídicas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Estas nanoestruturas são compostas de misturas de lipídios sólidos e lipídios líquidos em diferentes proporções (HU et al., 2006; PARDEIKE, HOMMOSS & MÜLLER, 2009).

#### **3.1 Nanopartículas lipídicas sólidas**

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) foram desenvolvidas no início da década de 1990 como uma alternativa ao uso de emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (MEHNERT & MÄDER,

2001). Tratam-se de sistemas matriciais organizados, constituídos de lipídeos sólidos a temperatura ambiente e corporal. Tais partículas são, geralmente, constituídas de 0,1% (p/p) a 30% (p/p) de lipídeos, estabilizadas com 0,5% (p/p) a 5% (p/p) de tensoativos (LUCKS & MÜLLER, 1991).

Várias técnicas têm sido descritas na literatura para a preparação de nanopartículas lipídicas sólidas, incluindo a homogeneização a alta pressão (MEHNERT & MÄDER, 2001; WISSING, KAYSER & MÜLLER, 2004), emulsificação e difusão do solvente (HU et al., 2002; TROTTA, DEBERNARDI & CAPUTO, 2003), injeção do solvente (ou deslocamento do solvente) (SCHUBERT & MÜLLER-GOYMANN, 2003), inversão de fases (HEURTAULT et al., 2002) e dupla emulsão (GARCÍA-FUENTES, TORRES & ALONSO, 2002). A elevada estabilidade física da NLS, o uso de lipídios biocompatíveis e biodegradáveis, o tamanho em escala nanométrica e a proteção do fármaco encapsulado são características que tornam esses sistemas promissores para sua administração. No entanto, a capacidade de incorporação de fármacos nas NLSs é limitada, devido à baixa solubilidade dos mesmos no lipídeo fundido. Além disso, tais partículas são constituídas por uma rede cristalina, em que as moléculas dos lipídeos encontram-se altamente organizadas, permitindo a incorporação de apenas uma pequena quantidade do fármaco no espaço situado entre as cadeias dos lipídeos (FREITAS & MÜLLER, 1999). Para contornar este problema, a estrutura da matriz lipídica pode ser modificada pelo uso de lipídeos mais complexos, como mono-, di- e triglicerídeos de diferentes comprimentos de cadeia, ou a utilização de misturas de lipídeos sólidos e líquidos (WISSING, KAYSER & MÜLLER, 2004). Outras desvantagens descritas para este sistema incluem o crescimento das partículas e a imprevisível tendência à gelificação (WESTESEN & SIEKMANN, 1997; MEHNERT & MÄDER, 2001).

Apesar da baixa capacidade de incorporação de fármacos, as NLSs possuem muitas características vantajosas para aplicação dérmica. Estes carreadores coloidais fornecem perfis de liberação controlada de muitas substâncias, e são constituídos de lipídios fisiológicos e biodegradáveis que exibem baixa toxicidade, o que se traduz por uma excelente tolerabilidade. A pequena dimensão assegura um contacto próximo com o estrato córneo, que permite aumentar a quantidade de fármaco que penetra na pele. Além disso, após a aplicação tópica e

evaporação da água da nanodispersão, estas partículas formam uma camada adesiva oclusiva sobre a pele. A hidratação do estrato córneo pode aumentar, levando a redução do empacotamento dos corneócitos e aumento das fendas entre as células, permitindo a penetração de fármacos nas camadas mais profundas da pele (SCHÄFER-HORTING, MEHNERT & KORTING, 2007).

Inúmeros trabalhos descrevem o interesse das NLSs no aumento da penetração de fármacos através da pele. Bhalekar e colaboradores (2009) prepararam NLSs contendo nitrato de miconazol pelo método de homogeneização a quente, usando o behenato de glicerila (Compritol 888 ATO<sup>®</sup>) como lipídeo, e polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>) e monoestearato de glicerila como estabilizantes. Os ensaios de permeação foram conduzidos em célula de difusão do tipo Franz, usando pele de cadáver como modelo de membrana. Géis de carbopol 940, em diferentes concentrações, foram preparados a partir das dispersões de NLSs contendo o fármaco. Os autores evidenciaram um aumento significativo da quantidade de fármaco retido na pele com o uso do gel contendo as NLSs, em comparação com um gel comercial de miconazol, obtendo assim uma melhora do efeito antifúngico na pele.

Lv e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de penciclovir a partir do monoestearato de glicerila e fosfatidilcolina de ovo, usando a técnica de dupla-emulsão (a/o/a). Estudos de penetração cutânea do pentaciclovir através da pele de ratos, realizados em células de difusão tipo Franz, mostraram o aumento da quantidade de fármaco permeada em relação à formulação comercial em cerca de duas vezes. Análises microscópicas evidenciaram a alteração da morfologia aparente do estrato córneo, com rompimento das junções das camadas dos corneócitos, o qual foi a possível razão para o aumento da permeação dérmica do pentaciclovir.

O efeito de liberação sustentada de carreadores lipídicos foi observado por Pathak e Nagarsenker (2009). Estes autores prepararam e caracterizaram nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) contendo um anestésico local, a lidocaína, pelo método de dispersão a quente com uso de ultrassom. Behenato de glicerila (Compritol 888 ATO<sup>®</sup>), palmito-estearato de glicerila (Precirol ATO<sup>®</sup>), e triglicerídeos de ácido caprílico/cáprico (Miglyol 810<sup>®</sup>) foram usados para constituir as partículas lipídicas, as quais foram estabilizadas com polissorbato 80 (Tween 80<sup>®</sup>). Os estudos

de permeação através da pele de porco, em células de difusão tipo Franz, mostraram que os dois sistemas estudados, quando incorporados em gel, conduzem à liberação sustentada da lidocaína. Neste estudo, a duração do efeito anestésico do fármaco foi em torno de 5 a 6 vezes maior que aquele produzido após aplicação do gel comercial Xylocaine®.

### 3.2. Nanoemulsões

Do ponto de vista farmacêutico, nanoemulsões (NE) podem ser definidas como sistemas cineticamente estáveis, apresentando gotículas de óleo de diâmetro inferior ao micrômetro (geralmente entre 100 e 500 nm) uniformemente dispersas em uma fase aquosa, estabilizada por um sistema tensoativo adequado, podendo ser do tipo óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o) (BENITA, 1998). Também são conhecidas como miniemulsões ou emulsões submicrométricas, e ao contrário das microemulsões sua formação geralmente requer uma fonte de energia (CONSTANTINIDES, CHAUBAL & SHORR, 2008; WANG et al., 2009). Apresentam-se como líquidos de baixa viscosidade, sendo que as moléculas de reduzida solubilidade aquosa encontram-se preferencialmente solubilizadas no óleo e/ou adsorvidas na fase interface da nanoestrutura (WASHINGTON, 1996; TROTTA *et al.*, 2002; VANDAMME, 2002; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET & L'ALLORET, 2004). As propriedades das nanoemulsões dependem não só das condições termodinâmicas, ou seja, da composição, temperatura e pressão, mas também do método de preparação e, particularmente, da ordem de adição dos componentes (WANG et al., 2009). Os métodos de preparo das NE são similares aos das nanopartículas lipídicas sólidas citadas anteriormente, porém ao invés do uso de um lipídio sólido, utiliza-se um lipídio líquido na sua formulação.

Alguns trabalhos têm demonstrado algumas vantagens desses sistemas no que se refere à redução de efeitos colaterais, aumento da biodisponibilidade, ou ainda, melhoria da estabilidade de alguns fármacos veiculados, quando comparadas com formulações convencionais (PIEMI *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2004; YILMAZ & BORCHERT, 2006). Além disso, outras vantagens das nanoemulsões incluem segurança toxicológica e alto conteúdo da fase lipídica, bem como a possibilidade de produção em grande escala (MEHNERT & MÄDER, 2001). Ainda, vantagens de nanoemulsões sobre

macroemulsões grosseiras ou emulsões incluem uma maior área de superfície e ausência dos fenômenos de cremação, floculação, coalescência e sedimentação. Podem se apresentar como líquidos, sprays, espumas, cremes, pomadas e géis (CONSTANTINIDES, CHAUBAL & SHORR, 2008). A possibilidade de liberação controlada de fármacos incorporados nas nanoemulsões é limitada, devido ao pequeno tamanho e o estado líquido do carreador. Para a maioria dos fármacos, uma rápida liberação é observada (MEHNERT & MÄDER, 2001).

No desenvolvimento de produtos de uso tópico, uma das principais vantagens das nanoemulsões em comparação aos sistemas convencionais está relacionada ao seu reduzido diâmetro de gotícula, o que permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando em uma elevada superfície de contato do sistema com este órgão. Estas formulações também podem promover a penetração de substâncias de interesse por meio da fluidização natural da pele, uma vez que os óleos e tensoativos presentes na formulação podem fazer com que as camadas da pele se desestruem, favorecendo a penetração (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; SONNEVILLE-AUBRUN, SIMONNET & L'ALLORET, 2004).

Objetivando reduzir as limitações à administração oral de ropinirol, as quais incluem baixa biodisponibilidade, elevado número de doses diárias, decorrente de seu curto tempo de meia vida plasmática, e presença de efeitos colaterais indesejáveis, Azeen e colaboradores (2009) investigaram a potencial aplicação deste fármaco pela via cutânea, após a incorporação em nanoemulsões. NEs de monocaprilato de polietilenoglicol (Capryol 90<sup>®</sup>) foram preparadas e estabilizadas com monolaurato de sorbitano polioxietilenado (Tween 20<sup>®</sup>) e éter monoetilico de dietilenoglicol (Carbitol<sup>®</sup>), como tensoativo e cotensoativo, respectivamente. Os efeitos da composição da nanoemulsão sobre a permeação cutânea, incluindo a proporção e concentração de tensoativo e cotensoativo, foram avaliados em pele de rato, utilizando células de difusão tipo Franz. Todas as nanoemulsões mostraram um aumento significativo nos parâmetros de fluxo no estado estacionário e coeficiente de permeabilidade, quando comparado ao controle. Entretanto, a massa de fármaco permeado através da pele variou consideravelmente em função da concentração e proporção da mistura de tensoativo/cotensoativo empregada na preparação das nanoemulsões. Géis contendo as nanoemulsões foram obtidos,

utilizando o Carbopol 934 como agente gelificante. Neste caso, a permeação cutânea foi reduzida com o aumento da viscosidade da preparação. Por outro lado, o aumento da concentração de fármaco aplicado aumentou a quantidade de fármaco permeado. A nanoemulsão em gel mostrou um aumento de 7,5 vezes na taxa de permeação da pele quando comparado com o hidrogel convencional. Estudos de irritação cutânea mostraram que a formulação nanoemulsionada é segura para aplicação transdérmica (AZEEM et al., 2009).

Zhou e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões de lecitina, sem qualquer tensoativo sintético, usando somente óleo de serpente, lecitina de soja, glicerol e água na sua preparação. O efeito de proporção de glicerol e água, assim como da concentração de lecitina, sobre as propriedades físicas da nanoemulsão, como tamanho da gota, viscosidade e morfologia, foram avaliados. A incorporação da nanoemulsão em um creme o/a melhorou significativamente a capacidade de hidratação na pele, atingindo valores cerca de 2,5 vezes maiores quando a concentração da nanoemulsão no creme foi de 10%. A melhora da penetração dérmica também foi evidenciada, quando o creme contendo a NE encapsulando o corante vermelho foi aplicado sobre a pele abdominal de ratos. A fluorescência da derme dos animais que receberam o creme contendo o corante incorporado na NE foi cerca de 9,9 vezes maior do que aquela produzida pela aplicação do creme contendo o vermelho de Nilo não encapsulado. Este efeito foi atribuído à maior hidratação cutânea proporcionada pelo uso da nanoemulsão.

Nanoemulsões (NE) constituídas de triacilgliceróis de cadeia média (MCT) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) constituídos de uma mistura de palmitato cetila e MCT foram produzidos objetivando a incorporação da coenzima Q10, e caracterizados quanto à estabilidade, antes e após a incorporação em hidrogéis de goma xantana. As dispersões de CLN contendo Q10, constituídas de diferentes proporções de lipídeo sólido e óleo demonstram boa estabilidade física e química, sendo que estudos de estabilidade acelerada evidenciaram a maior estabilidade química da Q10 nas CLN, quando comprado as NEs. Estudos de permeação, realizados em células de difusão tipo Franz, foram conduzidos usando epiderme humana obtida de cirurgia de abdominoplastia em mulheres entre 25 e 60 anos. Estudos reológicos demonstraram que ambas dispersões de CLN e a NE possuíam fluxo pseudoplástico, com mais características de líquidos, enquanto que os hidrogéis obtidos a partir



das mesmas apresentaram fluxo plástico com tixotropia, mostrando propriedades mais elásticas do que viscosas. Os estudos de permeação *in vitro* indicaram que a quantidade de Q10 liberado e a oclusão foram os aspectos preponderantes na promoção da penetração profunda da Q10 na pele (JUNYAPRASERT et al., 2009).

Com o objetivo de aproveitar o potencial terapêutico da cafeína contra a fotocarcinogênese, Shakeel e Ramadan (2010) desenvolveram nanoemulsões contendo este fármaco. Diferentes nanoemulsões a/o contendo cafeína foram preparadas e caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula, viscosidade e índice de refração. Os estudos *in vitro* de permeação cutânea foram realizados em células de difusão de Franz, usando pele de rato como modelo de membrana de permeação. A permeação das formulações otimizadas foi comparada com aquela produzida após aplicação de uma solução aquosa do mesmo fármaco. Todas as formulações testadas levaram à obtenção de valores de fluxo no estado estacionário ( $J$ ), coeficiente de permeabilidade ( $K_p$ ) e razão de melhora ( $J_{\text{da formulação}}/J_{\text{do controle}}$ ) superiores ao controle. Entretanto, as características de tamanho da gota, o índice de polidispersão e a viscosidade das formulações afetaram a quantidade de cafeína permeada. Estes resultados sugerem que nanoemulsões a/o podem ser bons carreadores para a administração transdérmica de cafeína.

Shakeel e colaboradores (2007) investigaram o potencial das nanoemulsões para administração transdérmica do aceclofenaco. A região de formação de NE foi identificada por meio da construção de diagramas de fases pseudoternários, utilizando diferentes óleos, tensoativos e cotensoativos. Estudos de permeação cutânea do aceclofenaco foram conduzidos em células de difusão tipo Franz, usando pele abdominal de ratos como modelo de membrana. Os perfis de permeação do aceclofenaco foram comparados após a aplicação do gel convencional e do gel contendo a NE. Um aumento significativo nos parâmetros de permeabilidade, tais como fluxo do estado estacionário ( $J$ ), coeficiente de permeabilidade e razão de melhora ( $J_{\text{da formulação}}/J_{\text{do controle}}$ ) foi observado após aplicação de géis contendo as nanoemulsões. Entretanto, a redução do tamanho da gota e da viscosidade da preparação favoreceu a penetração do aceclofenaco. Estudos de atividade anti-inflamatória evidenciaram um aumento significativo nos valores do percentual de inibição do edema de pata de ratos induzido por

carragenina, após aplicação do gel contendo a nanoemulsão, quando comparado ao gel convencional de aceclofenaco.

### 3.3. Microemulsões

Microemulsões (MEs) são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de tensoativos. As MEs foram primeiramente descritas por Hoar e Shulman em 1943, após evidenciarem a formação espontânea de sistemas transparentes quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico e um álcool graxo de cadeia média. Entretanto, o termo microemulsão foi utilizado somente no final da década de 1950 por Schulman e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2004). As microemulsões podem apresentar diferentes estruturas: água em óleo (a/o), óleo em água (o/a) ou estruturas bicontínuas, as quais podem exibir diferentes comportamentos para a liberação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos (KRAUEL et al., 2005; NAZAR, KHAN & SHAH, 2009). Ao contrário das NE, as microemulsões são formadas sem o fornecimento de energia mecânica adicional, quando a proporção necessária de componentes é atingida (KREILGAARD, 2002; SCHMIDTS et al., 2009).

Os aspectos que determinam a formação de microemulsões estão relacionados às propriedades físico-químicas da fase aquosa, fase oleosa e dos tensoativos. As condições que governam as interações entre os componentes para a formação das ME são várias, no entanto, aquelas que são essenciais incluem a obtenção de uma tensão interfacial água/óleo muito baixa, a formação de um filme interfacial de tensoativo altamente fluido, a penetração e a associação das moléculas da fase oleosa com o filme interfacial de tensoativo. A estabilidade da microemulsão pode ser afetada pela adição de tampões, eletrólitos, conservantes, polímeros e fármacos, os quais podem alterar a estrutura, e a região de existência da microemulsão. Normalmente a temperatura também exerce um efeito na formação da ME, visto que o balanço hidrofílico-lipofílico dos tensoativos pode ser alterado com a alteração da temperatura, desestabilizando a interface (KREILGAARD, 2002).

A composição das microemulsões é determinada por um equilíbrio entre os componentes da formulação. Entretanto, estes componentes devem ser atóxicos e capazes de preencher os requisitos de um bom veículo para uma ótima absorção transdérmica, por exemplo, alta solubilidade e alta atividade termodinâmica do fármaco de interesse. Como a concentração de tensoativos e de óleo na microemulsão é geralmente alta, é importante considerar que as ME são potencialmente irritantes (KREILGAARD, 2002).

Microemulsões são sistemas reservatórios, os quais têm demonstrado aumentar significativamente a penetração cutânea de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, quando comparado aos veículos convencionais, como soluções aquosas, óleos puros, soluções micelares, emulsões e lipossomas. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as vantagens das microemulsões na administração transdérmica de fármacos. Em primeiro lugar, uma grande quantidade de fármaco pode ser incorporada na formulação, devido à alta capacidade de solubilização destes sistemas. Isto aumenta consideravelmente o gradiente de concentração, favorecendo a partição do fármaco em direção ao estrato córneo. Em segundo lugar, a taxa de permeação de um fármaco na microemulsão pode ser aumentada, alterando a afinidade do fármaco em relação à fase interna de modo a favorecer o particionamento do mesmo em direção a pele. Assim, a taxa máxima de liberação do fármaco das ME depende da mobilidade interna do fármaco no veículo, o qual é determinado pela composição e estrutura interna da microemulsão. Finalmente, o tensoativo e cotensoativo utilizados na preparação das microemulsões podem reduzir a barreira difusional, atuando como promotores de penetração, uma vez que podem desestruturar as camadas da pele, facilitando a penetração de fármacos (KREILGAARD, 2002; SINTOV & BOTNER, 2006; SPERNATH & ASERIN, 2006).

Diferentes microemulsões constituídas de miristato de isopropila, caprato e caprilato de glicerol (Captex 355 EP/NF) e triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Labrafac CC) como fase oleosa, e Tween 20 e Span 20 como tensoativo e cotensoativo, respectivamente, foram preparadas com o intuito de veicular aciclovir para o tratamento de infecções virais cutâneas. Estudos de permeação *in vitro* através da pele de ratos foram realizados utilizando células de difusão tipo Franz. Conforme esperado, a quantidade acumulada de aciclovir permeada através da pele por unidade de área foi

significativamente maior após a aplicação das microemulsões, quando comparado aos resultados obtidos com o creme comercial e com uma pomada de PEG convencional contendo este fármaco. Um efeito promotor foi obtido com a adição de eucaliptol, óleo de menta ou transcutool às formulações de MEs. A quantidade de aciclovir retida na pele foi significativamente maior em todas formulações microemulsionadas (com e sem promotor), quando comparada a retenção observada com os uso do creme ou da pomada. Estes resultados indicaram que as formulações microemulsionadas penetram dentro da pele e formam microreservatórios de fármacos, os quais podem fornecer quantidades suficientes dos mesmos por um período prolongado, suprimindo, assim, o crescimento viral mais efetivamente. Estudos de atividade antiviral *in vivo* foram realizados usando modelo de infecção cutânea VHS-1 em ratos. Uma simples aplicação do aciclovir microemulsionado contendo Transcutol 2,5% resultou na supressão completa do desenvolvimento de lesões herpéticas na pele (SHISHU, RAJAN & KAMALPREET, 2009).

Teichmann e colaboradores (2007) usaram a curcumina como marcador lipofílico, com o objetivo de avaliar a influência do veículo e a importância da via folicular na penetração de fármacos aplicados topicamente, em humanos. Uma formulação microemulsionada e um creme anfifílico contendo curcumina foram preparados e aplicados em regiões delimitadas do antebraço de voluntários. O método do *tape stripping* foi utilizado para remover o estrato córneo, assim as profundidades de penetração do corante dentro dos estratos córneos foram comparados. Diferenças na distribuição e localização do corante dentro do estrato córneo foram observadas por microscopia de varredura a laser. Os estudos demonstraram que a penetração da curcumina microemulsionada, tanto no estrato córneo quanto nos folículos pilosos, foi maior em comparação que aquela obtida após a aplicação do creme anfifílico. As camadas lipídicas e, presumivelmente, os folículos pilosos pareceram ser os caminhos preferenciais para a penetração do corante lipofílico aplicado na forma de ME, conforme indicado pelas observações microscópicas.

Vicentini e colaboradores (2008) avaliaram o potencial de utilização de uma microemulsão a/o para administração tópica da quercetina. A liberação tópica e transdérmica da quercetina foram avaliadas *in vitro* em células de difusão tipo Franz, empregando a pele de porco como modelo de membrana. A administração da microemulsão

a/o levou ao aumento da penetração da quercetina na camada córnea e na epiderme/derme *in vitro* e *in vivo*, quando comparado com a aplicação de soluções de quercetina usadas como controle. Os parâmetros de irritação na pele, como a formação de eritema, espessamento da epiderme e infiltração das células inflamatórias, não foram alterados após a aplicação das MEs por até 2 dias consecutivos. Além disso, o uso da ME contendo quercetina impediu significativamente a depleção de GSH e a secreção/atividade das metaloproteinases, após a aplicação no dorso de camundongos sem pelo, 1 hora antes e 5 minutos após à exposição à radiação UVB.

Elshafeey, Kamel e Fathallah (2009) investigaram a viabilidade da utilização de uma microemulsão na administração transdérmica de tartarato de tolterodina. O efeito de microemulsões obtidas a partir de uma mistura de Labrasol:Plurol (3:1), miristato de isopropila e água sobre a permeação da tolterodina através de pele de suíno foi estudada *in vitro*, utilizando células de difusão tipo Franz. Estudos foram realizados em voluntários humanos a fim de comparar o perfil farmacocinético da tolterodina após aplicação tópica e oral. A microemulsão contendo uma maior quantidade de água melhorou significativamente a penetração do fármaco através da pele, quando comparado com os resultados obtidos após aplicação de soluções contendo tolterodina em ácido oléico, em uma mistura de propilenoglicol e tampão fosfato isotônico pH 7,4 (1:1). Em contraste com os resultados obtidos após a administração por via oral, uma atividade sustentada foi observada em até 72 horas após a aplicação transdérmica da microemulsão em voluntários humanos, em decorrência da liberação controlada do fármaco na circulação sistêmica.

### 3.4 Sistemas de liberação contendo resveratrol

Poucos trabalhos relatam a incorporação do resveratrol em sistemas de liberação de fármacos. Yao e colaboradores (2006) avaliaram a liberação *in vitro* do resveratrol a partir de nanopartículas de quitosana. Fang e colaboradores (2007) desenvolveram lipoesferas acusticamente ativas (LAAs) contendo resveratrol, usando perfluorcarbonos e óleo de coco como núcleos da fase interna, e estabilizadas usando óleo de coco. Os sistemas desenvolvidos foram capazes de retardar a liberação *in vitro* do resveratrol, utilizando células de difusão do tipo Franz, com membrana de celulose, tanto na presença

e ausência de plasma (FANG et al., 2007). Lu e colaboradores (2009) prepararam complexos de inclusão do resveratrol com a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) e a atividade antioxidante dos complexos formados foi avaliada pela atividade sequestradora do radical livre (DPPH). A capacidade de inclusão da HP- $\beta$ -CD foi maior do que a da  $\beta$ -CD, e a capacidade de sequestrar o DPPH aumentou com o aumento da concentração de ciclodextrinas, assim sendo maior na HP- $\beta$ -CD. Contudo a atividade antioxidante do resveratrol livre mostrou pouca diferença quando comparado com o resveratrol complexado em uma mesma concentração, sugerindo que o fenômeno de inclusão tem pouca influência na atividade antioxidante.

Hung e colaboradores (2008) avaliaram a viabilidade de liberação tópica/transdérmica do resveratrol. O efeito do veículo sobre a permeação e deposição cutânea do resveratrol a partir de soluções saturadas foi avaliado. Neste estudo, os autores mostraram que o transporte do resveratrol através da pele foi intimamente relacionado ao tipo de veículo na qual ele foi formulado, sendo que o uso de tampões aquosos de pH mais baixos proporcionaram os melhores resultados de permeação/deposição cutânea. A penetração do resveratrol após a incorporação em diferentes tipos de hidrogéis também foi avaliada. Neste caso, a penetração do resveratrol através da pele foi fortemente afetada pela viscosidade do gel. Os autores concluíram que a via tópica pode ser uma via promissora para a administração do resveratrol com vistas ao tratamento de desordens cutânea.

NLSs contendo resveratrol foram preparadas pelo método da fusão/emulsificação, utilizando behenato de glicerila (Compritol 888 ATO<sup>®</sup>), fosfatidilcolina (Phospholipon<sup>®</sup> 80H) e poloxamer (Lutrol<sup>®</sup>) como excipientes. O efeito das NLSs brancas e contendo resveratrol sobre a internalização, crescimento, morfologia, atividade metabólica e material genético dos queratinócitos foi comparado ao produzido pelo resveratrol em solução. Tanto a solubilidade e estabilidade do resveratrol, quanto à liberação intracelular foram aumentadas pela incorporação do resveratrol nas NLSs. Imagens de fluorescência obtidas a partir das NLSs contendo cumarina-6 como fluorocromo demonstraram a rápida difusão de partículas com diâmetro menor que 180 nm através das membranas celulares, assim com a sua distribuição no citosol e localização na região perinuclear, sem indução de citotoxicidade. Por outro lado, o efeito citostático foi muito mais expressivo a partir das NLSs contendo resveratrol do que com o fármaco

em solução, indicando que as NLSs contribuem para a eficácia deste fármaco sobre a proliferação celular, com potencial benefício para a prevenção do câncer de pele (TESKAC & KRISTL, 2010).

Devido à lipofilicidade do resveratrol, micelas poliméricas foram preparadas a partir de copolímeros anfifílicos em bloco, pelo método da nanoprecipitação. As micelas poliméricas foram testadas em ensaios de viabilidade celular e de proteção frente à toxicidade causada pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (Abeta), em cultura de células PC12. Em concentrações correspondente a 5 e 10  $\mu$ M de resveratrol, a incubação das células com as micelas não resultou em toxicidade celular, enquanto a pré-incubação protegeu as células PC12 contra o dano produzido pela Abeta de maneira dose dependente, ao atenuar o estresse oxidativo intracelular e a atividade da caspase-3 (LU et al., 2009).

SHAO e colaboradores (2009) desenvolveram nanopartículas biodegradáveis pela técnica da nanoprecipitação, utilizando o copolímero em bloco da policaprolactona e metoxipolietilenoglicol (PCL-mPEG) como material polimérico. As nanopartículas contendo resveratrol, em baixa concentração, induziram à morte celular, de modo significativamente maior que a produzida por doses equivalentes de resveratrol livre, demonstrando a maior capacidade das nanopartículas em penetrar as membranas celulares. Assim, juntamente com a alta eficiência de encapsulação do resveratrol, as nanopartículas biodegradáveis evidenciaram uma eficácia superior contra células de glioma.





---

**CAPÍTULO 2: PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
DE DISPERSÕES COLOIDAIS DE NANOCARREADORES  
LIPÍDICOS CONTENDO RESVERATROL DESTINADOS À  
ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA.**

---



*O resveratrol é um polifenol pertencente à classe dos estilbenos, presente na dieta humana (IGNATOWICZ & BAER-DUBOWSKA, 2001; BURNS et al., 2002). Esta substância tem demonstrado inúmeras atividades farmacológicas incluindo antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, cardioprotetora, entre outras. Entretanto, a biodisponibilidade oral desta substância é praticamente nula, em decorrência do seu elevado metabolismo colônico e hepático. Por outro lado, estudos relatam os benefícios do resveratrol sobre a pele, fazendo com que a liberação tópica deste composto constitua uma interessante alternativa à administração oral para o tratamento de várias desordens cutâneas. Apesar dos estudos de permeabilidade cutânea ter sido promissores, nenhuma evidência tem sido dada quanto à obtenção de concentrações terapêuticas deste fármaco na pele, sugerindo que outras estratégias possam ser empregadas para aumentar a permeação cutânea. Neste sentido, a nanoencapsulação do resveratrol pode ser considerada uma alternativa promissora para a aplicação tópica cutânea.*

*Entre os carreadores de fármacos com potencial aplicação tópica destacam-se os sistemas nanoestruturados lipídicos. Tais sistemas podem ser obtidos a partir de lipídios sólidos, líquidos ou misturas deles em diferentes proporções, pelo emprego de várias técnicas de preparação. Diferenciam-se ainda como sistemas matriciais ou reservatórios de diferentes tamanhos, ainda que na faixa nanométrica ( $< 1 \mu\text{m}$ ). Suas principais características incluem excelente estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis frente à degradação, capacidade de controle da liberação, excelente tolerabilidade, possibilidade de vetorização, além de não apresentar problemas relacionados à produção em grande escala e à esterilização (WANG, SUN, ZHANG, 2002; WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004; MANJUNATH, REDDY, VENKATESWARLU, 2005).*

*Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (NE) ou microemulsões (ME) podem ser obtidas pela técnica de difusão do solvente a quente, alterando unicamente a composição da formulação. Estes sistemas exibiram diferentes capacidades em incorporar a quercetina e, especialmente a microemulsão, foi capaz de aumentar consideravelmente a eficácia terapêutica deste polifenol em modelo de asma alérgica em ratos, tendo este resultado sido relacionado ao aumento da sua biodisponibilidade oral (ROGERIO et al., 2010). Neste*

*trabalho, a capacidade das NLS, NE e ME em incorporar o resveratrol foi avaliada, visando o emprego destes sistemas para a aplicação tópica cutânea. Para isto um método de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado. Visando aumentar a viscosidade e obter uma preparação com características mais adequadas para aplicação na pele, a hidroxietilpropilcelulose foi adicionada à fase externa das preparações. Os nanogéis obtidos foram caracterizados quanto ao teor de resveratrol, viscosidade e morfologia. Estes resultados são apresentados em forma de um artigo científico a ser submetido a Química Nova.*

**Preparação e caracterização de dispersões coloidais de  
nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à  
administração cutânea**

Daiane Nemen e Elenara Lemos-Senna<sup>\*</sup>

*Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências  
Farmacêuticas,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade,  
88040-900, Florianópolis, SC, Brasil*

<sup>\*</sup>e-mail: [lemos@ccs.ufsc.br](mailto:lemos@ccs.ufsc.br)



PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF COLLOIDAL DISPERSIONS CONSTITUTED OF RESVERATROL-LOADED LIPID-BASED NANOCARRIERS FOR CUTANEOUS ADMINISTRATION. SLN, NE and ME were prepared by the hot solvent diffusion method, using tristearin and/or castor oil as oily phase, and soy lecithin and Solutol HS 15 as surfactants. Mean particle sizes ranged from 20 to 215 nm and negative zeta potentials were obtained for all nanocarriers. Nanogels were obtained after incorporation of HEC in the aqueous phase of the colloidal suspensions and their morphology and rheological properties were evaluated. An HPLC method was developed to determine resveratrol concentration and it was specific, linear, exact and precise. However, resveratrol content was significantly affected by the type of the lipid nanocarrier. The highest values were attained when MEs were obtained.

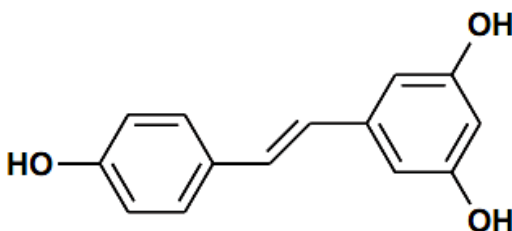
Keywords: resveratrol, lipid-based nanocarriers, nanogels





## INTRODUÇÃO

O resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) (Figura 1) é uma fitoalexina presente numa grande variedade de espécies vegetais, incluindo amoras, amendoim e uvas, e, portanto, é um constituinte da dieta humana. Este composto, tal como outros membros da família do estilbeno, é produzido nos vegetais em resposta ao ataque de patógenos, à radiação ultravioleta e à exposição ao ozônio. A *Vitis vinifera*, ou a uva, sintetiza o resveratrol como meio de proteção às infecções fúngicas, sendo, portanto, encontrado em altas concentrações no vinho<sup>1,2</sup>.



**Figura 1.** Estrutura química do *trans*-resveratrol.

Vários estudos têm destacado e comprovado os benefícios do resveratrol à saúde. Esta substância tem demonstrado propriedades quimiopreventivas<sup>3,8</sup>, antioxidante<sup>9,10</sup>, antiplaquetária<sup>11</sup>, antifúngica<sup>12</sup>, anti-inflamatória<sup>13</sup>, cardioprotetora<sup>14,15</sup>, entre outras. O resveratrol age como efector biológico pleiotrópico que regula as três fases do processo da carcinogênese, ou seja, início, promoção e progressão do tumor<sup>1</sup>. Uma vez absorvidos, os agentes quimiopreventivos podem agir por diferentes mecanismos, seja pela inibição da ativação metabólica de compostos carcinogênicos, estímulo da detoxificação de metabólitos reativos, prevenção da sua interação com o DNA da célula e supressão da progressão do tumor. Experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* têm demonstrado que além de atuar nos mecanismos quimiopreventivos descritos acima, o resveratrol também possui potencial quimioterapêutico. De fato, o resveratrol suprime o crescimento de várias linhagens de células cancerosas, em parte pela inibição da DNA polimerase e ribonucleotídeo redutase ou pela indução da dispersão do ciclo celular ou apoptose<sup>16</sup>. Os efeitos anticarcinogênicos provocados pelo resveratrol também parecem estar associados à sua atividade antioxidante, visto que ele tem demonstrado inibir a ciclooxigenase,

hidroperoxidase, proteína quinase C, a fosforilação da Bcl-2, proteína quinase B (PKB ou Akt), quinase de adesão focal, NF-κB, metaloprotease de matriz tipo 9, e reguladores do ciclo celular<sup>17</sup>. O resveratrol também inibe a oxidação da LDL, por modular a atividade do metabolismo de lipídeos e lipoproteínas<sup>2,18</sup>, suprime a angiogênese<sup>18</sup>, e apresenta atividade estrogênica devido a sua semelhança estrutural com o agente estrogênico dietilestilbestrol<sup>2</sup>.

Apesar dos numerosos estudos sobre as propriedades dos compostos polifenólicos *in vitro*, estes efeitos frequentemente não são observados *in vivo*. A aparente discrepância entre estudos *in vitro* e *in vivo* pode ser parcialmente atribuível à baixa absorção e elevado metabolismo destes compostos<sup>19</sup>. Após administração oral na dose de 25 mg, a absorção do resveratrol demonstrou ser de pelo menos 70%. Entretanto, a sua biodisponibilidade foi quase nula; unicamente traços da molécula na forma inalterada foram encontrados no plasma. A rápida conjugação com sulfato no intestino e fígado foi responsável pela baixa biodisponibilidade oral do resveratrol<sup>20,21</sup>. Outros fatores que limitam o aproveitamento terapêutico do resveratrol incluem a sua baixa estabilidade frente à oxidação e baixa solubilidade aquosa<sup>22</sup>.

Inúmeros estudos relatam os benefícios do resveratrol sobre a pele, fazendo com que a liberação tópica deste composto constitua uma interessante alternativa à administração oral para o tratamento de várias desordens cutâneas. Estudos evidenciaram fortes propriedades antiproliferativas e quimiopreventivas contra a carcinogênese<sup>23-26</sup>, proteção contra os danos causados pela radiação ultravioleta, e atividade antimicrobiana contra dermatófitos e ao vírus da *Herpes simplex*<sup>27-28</sup>. Apesar de os estudos de permeabilidade cutânea terem sido promissores, nenhuma evidência tem sido dada quanto à obtenção de concentrações terapêuticas deste fármaco na pele, sugerindo que outros sistemas de liberação possam ser testados com o intuito de potencializar a permeação cutânea e obter preparações eficazes para o tratamento de desordens cutâneas<sup>29</sup>. Portanto, o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores pode ser considerado uma interessante abordagem para explorar as propriedades deste composto na clínica.

Carreadores coloidais diferem entre si em função da sua composição, capacidade de incorporar fármacos e aplicabilidade, mas a característica comum é o tamanho de partícula submicrométrico. Entre os carreadores nanoestruturados com potencial aplicação tópica

destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), as nanoemulsões (NE) e as microemulsões (ME). Estes sistemas nanoestruturados são constituídos por lipídios altamente purificados e misturas complexas de glicerídeos apresentando tamanho de partícula variável. Suas principais características incluem excelente estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis frente à degradação, capacidade de controle da liberação, excelente tolerabilidade, possibilidade de vetorização, além de não apresentar problemas relacionados à produção em grande escala e à esterilização<sup>30-32</sup>. Enquanto as NLSs são sistemas matriciais organizados obtidos a partir de triglicerídeos sólidos, as NEs submicrométricas são obtidas como dispersões óleo em água, apresentando elevada estabilidade cinética, em decorrência do seu reduzido tamanho de gota. As MEs, por outro lado, são sistemas isotrópicos, transparentes, de baixa viscosidade e termodinamicamente estáveis, obtidas quando uma mistura de surfactantes apropriada é usada<sup>33,34</sup>. Neste trabalho, a capacidade destes sistemas em incorporar o resveratrol foi avaliada, visando o seu aproveitamento terapêutico no tratamento de patologias cutâneas. Para tal, a hidroxietilcelulose foi utilizada para conferir viscosidade adequada às formulações. Existem muitos relatos descrevendo métodos para quantificação do resveratrol. Entretanto, a maioria deles tem sido focada em determinações simultâneas de vários compostos do vinho<sup>2,35,36</sup>, e identificação de metabólitos do resveratrol em plasma humano e animal<sup>20,37,38</sup>. Assim, este trabalho também descreve o desenvolvimento e validação de um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação do resveratrol nas dispersões coloidais e nos nanogéis obtidos após a incorporação da hidroxietilcelulose.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

O *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-*trans*-estilbeno, aproximadamente 99% de pureza) foi adquirido da Sigma (St. Louis, USA). O óleo de rícino e a lecitina de soja hidrogenada (Lecitina S75-3N<sup>®</sup>) foram adquiridos da Via Pharma (São Paulo, Brasil) e SP Pharma (São Paulo, Brasil), respectivamente. Hidroxietilcelulose (HEC) (Natrosol<sup>®</sup>) foi adquirida da Denver-Cotia (São Paulo, Brazil). A triestearina (Dynasan 118) foi gentilmente doada pela Sasol (Louisiana,

EUA) e o hidroxiestearato de polietilenoglicol (Solutol HS-15<sup>®</sup>) foi doado pela Basf (Trostberg, Alemanha). Água ultra pura foi fornecida por sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA). Metanol grau HPLC foi adquirido da J.T Baker<sup>®</sup> (Phillipsburg, EUA). Etanol, acetona e outros reagentes químicos usados foram de grau analítico.

### **Preparação das dispersões coloidais de nanocarreadores lipídicos**

Os nanocarreadores lipídicos (NLS, NE e ME) foram preparados pelo método de difusão do solvente a quente<sup>39</sup>. Resumidamente, 10 mg de lecitina e 100 mg do lipídio (triestearina ou óleo de rícino) foram dissolvidos em 5 mL de uma mistura de acetona:etanol (60:40, v/v) a 60°C. A solução orgânica resultante foi rapidamente adicionada em 50 mL de uma solução aquosa contendo Solutol HS 15<sup>®</sup> (0,1 % para a obtenção das NLS e NE, ou 1,0 % para a obtenção da ME), mantido sobre agitação magnética a 82°C. A dispersão coloidal obtida foi então resfriada até temperatura ambiente sobre agitação magnética, o solvente orgânico evaporado sobre pressão reduzida, e o volume final foi ajustado para 20 mL. Finalmente, a dispersão coloidal foi filtrada através de filtro de papel quantitativo de 8 µm (J.Prolab, Brasil). Para a preparação dos nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol (NLS<sub>rv</sub>, NE<sub>rv</sub> e ME<sub>rv</sub>), o fármaco foi adicionado na fase orgânica das formulações em diferentes concentrações. As formulações foram preparadas em triplicata e armazenadas à 4°C sob proteção da luz. O efeito do tipo de nanocarreador lipídico e da quantidade inicial de resveratrol sobre o teor de fármaco nas dispersões coloidais foi avaliado por meio da análise da variância de duas vias usando o programa StatPlus<sup>®</sup> Profissional (AnalystSoft, Inc.).

### **Preparação dos nanogéis de resveratrol**

Para a obtenção de géis contendo os diferentes nanocarreadores lipídicos, 300 mg de hidroxietilcelulose (Natrosol<sup>®</sup>) foram adicionados a 20 mL de cada uma das dispersões (NLS<sub>rv</sub>, NE<sub>rv</sub>, ME<sub>rv</sub>). As misturas foram mantidas sob agitação magnética durante 12 horas em temperatura ambiente e posteriormente armazenadas à 4°C até análise.

Nanogéis contendo sistemas nanoestruturados sem fármaco foram preparados da mesma maneira.

### **Caracterização físico-química das dispersões coloidais nanocarreadoras lipídicas**

O tamanho médio e o potencial zeta das dispersões coloidais nanocarreadoras lipídicas foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a 25°C após diluição apropriada das amostras em água destilada. Cada análise de tamanho durou 120 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 173 °. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados como a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski.

### **Determinação do resveratrol nas dispersões coloidais e nanogéis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

#### **Condições instrumentais e analíticas**

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em um equipamento Perkin Elmer S200 (Shelton, EUA) equipado com desgaseificador Série 200, autoamostrador Série 200, detector UV-visível Série 200, bomba binária Série 200 e uma interface cromatográfica Série 600 LINK. O comprimento de onda do detector foi fixado em 312 nm e a área do pico foi analisada automaticamente usando um programa de software Totalchrom. Os experimentos foram conduzidos em fase reversa usando uma coluna C<sub>18</sub> Zorbax ODS (150 mm x 4,6 mm, 5 µm; Agilent Technologies, EUA), mantida a  $24 \pm 1$  °C. A fase móvel foi constituída de uma mistura de água:metanol (53:47, v/v) e foi eluída em modo isocrático em um fluxo de 1 mL/min.

## Validação do método analítico

Os parâmetros empregados para a validação do método de CLAE foram: especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e detecção. A validação foi realizada com base nas diretrizes da *International Conference on Harmonization (ICH)*<sup>40</sup> e Farmacopéia Americana<sup>41</sup>.

(a) *Especificidade* - A especificidade do método cromatográfico foi avaliada através da análise das dispersões coloidais e nanogéis sem fármaco a fim de verificar a possível interferência dos excipientes da formulação na quantificação do fármaco. A análise de cada uma das amostras foi realizada em triplicata.

(b) *Linearidade* - Soluções padrão de resveratrol em fase móvel foram obtidas nas concentrações de 0,4, 0,6, 0,8, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. As soluções foram injetadas no cromatógrafo em três replicatas cada e em três dias diferentes. Curvas de concentração de resveratrol em função da área do pico foram construídas e a linearidade do método na faixa de concentração testada foi avaliada pela análise da regressão linear.

(c) *Limites de detecção e quantificação* - Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados diretamente a partir da inclinação (S) e do desvio padrão do intercepto (DP), obtidos após a construção de três curvas de calibração. O limite de detecção foi expresso como  $LD = \frac{(3,3 \times DP)}{S}$  e o limite de quantificação como  $LD = \frac{(10 \times DP)}{S}$ .

(d) *Exatidão* - A exatidão foi investigada contaminando as dispersões coloidais brancas com concentrações conhecidas de resveratrol em três diferentes níveis (baixo, médio e alto), correspondendo à concentração final de 1,0, 2,0 e 4,0 µg/mL. As amostras foram extraídas com metanol e centrifugadas a 5000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante foi então coletada e diluída em fase móvel. As análises foram realizadas em triplicata, e a recuperação (R%) foi estimada.

(e) *Precisão* - A precisão do método foi determinada por medidas da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). A repetibilidade foi avaliada pela determinação de seis diferentes amostras de dispersões dos nanocarreadores lipídicos contendo 4 µg/mL de resveratrol, no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada através

da realização da análise em três dias diferentes. As amostras foram extraídas em metanol e centrifugadas a 5000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante foi então coletado e diluída em uma mistura de água:metanol (53:47, v/v). As áreas dos picos foram determinadas e comparadas. A precisão foi expressa como percentagem do desvio padrão relativo (DPR%).

### **Determinação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol**

Para a determinação do teor de resveratrol (concentração total), uma alíquota de cada dispersão coloidal ou do nanogel foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume final foi completado com metanol. Após, as amostras foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi diluída em uma mistura de água:metanol (53:47, v/v). As amostras foram injetadas no cromatógrafo em triplicata e as áreas dos picos médias referente ao resveratrol foram comparadas com a área do pico de uma solução padrão de concentração conhecida. A concentração foi expressa em  $\mu\text{g}$  de resveratrol por mL de dispersão. A eficiência de encapsulação (EE %) foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total de resveratrol e aquela encontrada no ultrafiltrado, obtido após ultrafiltração/centrifugação das dispersões coloidais utilizando unidades de filtração Ultrafree - MC (100.000 MWCO, Millipore, EUA). A recuperação do resveratrol nas dispersões nanocarreadoras foi calculada como sendo o percentual da concentração total de fármaco encontrado nas dispersões em relação à quantidade inicial adicionada.

### **Avaliação da viscosidade dos nanogéis de resveratrol**

A caracterização reológica dos nanogéis foi realizada usando um viscosímetro rotacional Brookfield DV-II +, com adaptador de pequenas amostras e *spindle* SC4-18 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, EUA), acoplado ao *Software* Rheocalc. As amostras de nanogéis de resveratrol foram mantidas a temperatura ambiente e submetidas a velocidades de rotação de 5, 10, 20 e 30 rpm, respeitando os limites de torque (entre 10% e 100%). Os valores de tensão de cisalhamento e viscosidade, em função do gradiente de cisalhamento, foram avaliados e comparados.

## **Avaliação da morfologia**

Uma alíquota de cada um dos nanogéis brancos (sem fármaco) foi transferida para recipientes de teflon e colocados em estufa à 45 °C até completa evaporação da água. Os filmes obtidos a partir dos nanogéis foram fixados em porta-amostras e recobertos com uma fina camada de ouro. As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG) (JEOL JSM-6701F, Japão), com tensão de aceleração de 5,0 kVa. Micrografias foram então obtidas com aumento de 18000, 7500, 45000 e 33000 vezes para o nanogel branco, NLS, NE e ME, respectivamente.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

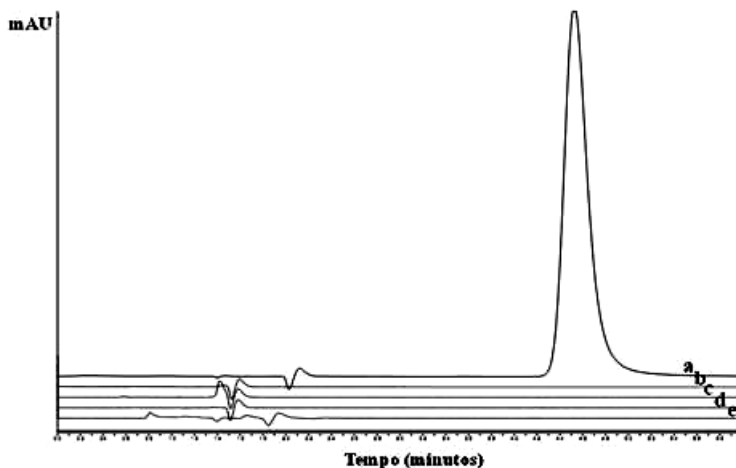
A administração cutânea de fármacos tem sido considerada uma via não-invasiva que exhibe inúmeras vantagens sobre as outras vias de administração. O emprego desta via evita o metabolismo de primeira passagem, possibilita o prolongamento da ação, permite a redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes da absorção sistêmica, e é mais aceitável para o paciente, principalmente quando o tratamento de distúrbios cutâneos é desejado. Entretanto, a administração cutânea ainda é um desafio na área farmacêutica, visto que o estrato córneo impõe uma barreira à passagem de fármacos, dificultando o alcance do mesmo nas diferentes camadas da pele. Diferentes estratégias têm sido testadas com o objetivo de romper a barreira imposta pela camada córnea e aumentar a passagem de fármacos através da pele, incluindo o emprego de sistemas nanoestruturados lipídicos<sup>42,43</sup>. O aumento da superfície de contato do fármaco com os corneócitos, o efeito oclusivo provocado sobre a pele, a rápida e constante liberação do fármaco, e a ação do tensoativo sobre a permeabilidade parecem estar envolvidos no aumento da permeação cutânea de fármacos a partir destes nanocarreadores<sup>44,45</sup>. Assim, buscando obter formulações destinadas à administração tópica cutânea, a encapsulação do resveratrol em sistemas nanoestruturados lipídicos foi realizada, usando o método de difusão do solvente a quente para a preparação das dispersões coloidais. Este método baseia-se na formação de uma emulsão óleo em água após a mistura da fase oleosa e aquosa previamente aquecidas, sob agitação



magnética. A rápida difusão do solvente orgânico no meio aquoso provoca uma turbulência na interface da emulsão (efeito Maragoni), resultando na formação espontânea de uma dispersão de tamanho submicrométrico<sup>46</sup>. As dispersões coloidais são obtidas em condições simples, não exigindo nenhum equipamento especial. Neste trabalho foi empregado a triestearina e o óleo de rícino como lipídio sólido e líquido para obtenção da fase oleosa da preparação, e a lecitina de soja e o Solutol HS 15, como tensoativos lipofílico e hidrofílico, respectivamente. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que em função da composição das formulações, ou seja, tipo de lipídio e concentração de Solutol HS 15 na fase aquosa, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (NE) e microemulsões (ME) podem ser obtidas. Neste caso, NLS e NE foram obtidas usando Solutol HS 15 0,1%. As ME foram obtidas com o uso de Solutol HS 15 1%<sup>47</sup>.

### **Desenvolvimento e validação da metodologia analítica**

A capacidade dos sistemas nanoestruturados lipídicos em incorporar o resveratrol foi avaliada e comparada, usando para isso os parâmetros de teor de fármaco e eficiência de encapsulação. Para tal, um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado, de modo a garantir que ele gere informações confiáveis e interpretáveis das amostras. As condições cromatográficas foram ajustadas em função das características físico-químicas do fármaco. Os reagentes e as proporções foram escolhidos de forma a garantir uma absorção suficiente e uma boa assimetria do pico. O espectro de absorção do resveratrol em metanol mostrou uma faixa de absorção máxima entre 302 e 322 nm, e o comprimento de onda de 312 nm foi então utilizado para a determinação direta do mesmo por CLAE. O melhor desempenho cromatográfico foi alcançado quando a mistura de metanol:água 47:53 (v/v) foi empregada como eluente, com um fluxo de 1 mL/min. Nestas condições o tempo de retenção do resveratrol foi em torno de 4,6 minutos. Um cromatograma típico obtido pelo método proposto é mostrado na Figura 2a. A especificidade do método foi avaliada por meio da análise das dispersões coloidais e dos nanogéis sem fármaco. Os cromatogramas (Figura 2b, 2c, 2d e 2e) mostram que o método é específico, e não há nenhuma interferência ou sobreposição dos excipientes com o pico de resveratrol.



**Figura 2.** Cromatograma típico obtido após injeção de: (a) solução padrão de resveratrol 4,0  $\mu\text{g/mL}$  e (b) NLS, (c) NE, (d) ME e (e) nanogéis sem fármaco.

A linearidade de resposta do detector foi avaliada para as várias soluções padrões no intervalo de 0,4 - 10  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores médios calculados para o coeficiente de correlação ( $r = 0,9999$ ,  $y = 173978,4x - 9990,8$ ; onde,  $x$  é a concentração e  $y$  é a área do pico absoluto) indicaram linearidade da curva de calibração. A validade dos ensaios foi verificada por meio da análise da variância (ANOVA), a qual confirmou a linearidade do método ( $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$ ;  $p > 0,05$ ). Os valores de LD e LQ calculados foram 0,09  $\mu\text{g/mL}$  e 0,26  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, indicando a sensibilidade do método para a quantificação do resveratrol nos sistemas nanoestruturados lipídicos.

O ensaio de exatidão foi realizado por meio da avaliação da recuperação do resveratrol após contaminação das dispersões coloidais brancas com uma solução padrão do fármaco em três diferentes níveis. Os resultados mostraram a inexistência de diferenças significativas entre os valores de concentração de resveratrol teóricos e encontrados. Os valores obtidos encontraram-se dentro da faixa de 97,75-101,73% (Tabela 1), satisfazendo os critérios de aceitação para o estudo.

**Tabela 1.** Resultados de recuperação do resveratrol após análise das dispersões coloidais por CLAE (n = 3).

<b>Amostras</b>	<b>Concentração teórica do resveratrol (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração experimental do resveratrol (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação do resveratrol (%)</b>	<b>DPR<sup>a</sup></b>
<b>NLS</b>	1,0	0,98	97,75	1,08
	2,0	1,99	99,52	0,55
	4,0	3,92	97,88	0,72
<b>NE</b>	1,0	1,00	100,16	0,82
	2,0	2,00	100,17	1,60
	4,0	3,99	99,73	3,10
<b>ME</b>	1,0	0,99	98,67	0,11
	2,0	1,99	99,49	1,96
	4,0	4,07	101,73	0,31

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

Os resultados obtidos na avaliação da precisão do método desenvolvido estão demonstrados na Tabela 2. Conforme pode ser observado nesta tabela, os valores dos DPR foram menores que 1,25%, indicando uma variabilidade intradia e interdia satisfatória. A quantidade de resveratrol encontrada em três dias diferentes foi equivalente para todas as dispersões coloidais testadas ( $P < 0,05$ ). O conjunto dos resultados de validação indicou que o método de cromatografia em fase reversa desenvolvido para determinação do resveratrol nos sistemas nanoestruturados lipídicos é específico, linear, exato e preciso.

**Tabela 2.** Resultados obtidos na avaliação da precisão do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

<b>Amostras</b>	<b>Dia</b>	<b>Recuperação do resveratrol (%)</b>	<b>DPR<sup>a</sup></b>
<b>NLS</b>	Interdia (n=3)		
	Dia 1	97,62	0,62
	Dia 2	97,67	0,45
	Dia 3	98,98	1,25
	Intradia (n=6)	97,50	0,50
<b>NE</b>	Interdia (n=3)		
	Dia 1	97,87	0,54
	Dia 2	98,29	0,43
	Dia 3	99,84	0,06
	Intradia (n=6)	97,72	0,47
<b>ME</b>	Interdia (n=3)		
	Dia 1	100,63	0,24
	Dia 2	100,54	0,22
	Dia 3	101,72	0,32
	Intradia (n=6)	100,68	0,22

<sup>a</sup> Desvio padrão relativo

### **Caracterização físico-química das dispersões coloidais**

A Tabela 3 demonstra as características de tamanho e potencial zeta das dispersões coloidais preparadas na ausência e na presença de diferentes quantidades iniciais de resveratrol. Como pode ser observado, o diâmetro médio das partículas das dispersões coloidais brancas variou em função do tipo de nanocarreador lipídico, sendo cerca de 221, 119 e 22 nm, para as NLS<sub>b</sub>, NE<sub>b</sub> e ME<sub>b</sub>, respectivamente, estando de acordo com estudos anteriores<sup>48,49,50</sup>. A adição do resveratrol às formulações não afetou o diâmetro médio das partículas. O índice de polidispersão, que é uma relação que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi baixo (< 0,3) para todas as dispersões obtidas, indicando a formação de sistemas monodispersos, sendo observado um menor valor de índice de polidispersão para a nanoemulsão. As análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, decorrente da presença da lecitina, sendo observado uma redução nos valores de carga superficial nas microemulsões, provavelmente devido à presença de maiores concentrações de Solutol HS 15, um surfactante não ionizável, na interface das partículas. Apesar das variações observadas nos valores do potencial zeta das formulações preparadas com fármaco, não foi possível afirmar a existência de algum efeito da quantidade inicial de fármaco sobre a carga superficial das partículas.

**Tabela 3.** Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos (n = 3).

Quantidade inicial de resveratrol		Tamanho (nm) $\pm$ DP (IP)	Potencial Zeta (mV) $\pm$ DP
Sem fármaco	NLS <sub>b</sub>	221,1 $\pm$ 18,4 (0,26 $\pm$ 0,01)	- 35,3 $\pm$ 4,1
	NE <sub>b</sub>	119,2 $\pm$ 2,5 (0,12 $\pm$ 0,02)	- 38,53 $\pm$ 0,7
	ME <sub>b</sub>	22,9 $\pm$ 3,8 (0,27 $\pm$ 0,02)	- 15,8 $\pm$ 0,6
5 mg	NLS <sub>r</sub>	223,9 $\pm$ 10,7 (0,24 $\pm$ 0,02)	-32,7 $\pm$ 3,2
	NE <sub>r</sub>	113,8 $\pm$ 5,8 (0,12 $\pm$ 0,03)	-28,3 $\pm$ 4,5
	ME <sub>r</sub>	21,4 $\pm$ 4,0 (0,31 $\pm$ 0,05)	-12,1 $\pm$ 1,6
10 mg	NLS <sub>r</sub>	193,2 $\pm$ 5,1 (0,21 $\pm$ 0,02)	-33,2 $\pm$ 2,8
	NE <sub>r</sub>	112,3 $\pm$ 0,8 (0,12 $\pm$ 0,07)	-41,3 $\pm$ 2,9
	ME <sub>r</sub>	19,19 $\pm$ 0,5 (0,19 $\pm$ 0,03)	-18,1 $\pm$ 0,8
15 mg	NLS <sub>r</sub>	203,5 $\pm$ 9,0 (0,28 $\pm$ 0,05)	-29,3 $\pm$ 3,0
	NE <sub>r</sub>	113,1 $\pm$ 5,0 (0,12 $\pm$ 0,02)	-35,8 $\pm$ 3,4
	ME <sub>r</sub>	19,88 $\pm$ 0,8 (0,22 $\pm$ 0,03)	-17,0 $\pm$ 2,7
20 mg	NLS <sub>r</sub>	228,0 $\pm$ 10,8 (0,254 $\pm$ 0,02)	-34,2 $\pm$ 2,2
	NE <sub>r</sub>	117,7 $\pm$ 2,2 (0,127 $\pm$ 0,01)	-40,6 $\pm$ 2,7
	ME <sub>r</sub>	19,37 $\pm$ 0,3 (0,178 $\pm$ 0,03)	-17,0 $\pm$ 2,6

Entre parênteses: índice de polidispersão (IP)

## **Determinação do teor, eficiência de encapsulação e recuperação do resveratrol**

Após a validação do método analítico e análise das dispersões coloidais por CLAE, o teor, eficiência de encapsulação e recuperação do resveratrol foram estimados. A eficiência de encapsulação foi maior de 94% para todas as formulações testadas, demonstrando que a maior parte do fármaco encontra-se associado ao nanocarreador. Entretanto, os valores de teor de fármaco variaram de 186, 9 a 852,8  $\mu\text{g/mL}$ , dependendo da formulação testada (Tabela 4). A análise estatística demonstrou que o teor de fármaco variou significativamente em função do tipo de nanocarreador (NLS, NE e ME) e com a quantidade inicial de resveratrol, visto que valores de  $F_{\text{calculado}}$  foram maiores que  $F_{\text{tabelado}}$  ( $\alpha = 0,05$ ), como observado na tabela 5. Após a aplicação do teste de Tukey, verificou-se que com a menor quantidade de fármaco (5 mg), não houve diferenças significativas entre os teores encontrados nas dispersões coloidais de SLN, NE e ME. Diferenças foram encontradas entre os carreadores quando a concentração inicial de fármaco foi igual ou maior que 10 mg, com valores de recuperação variando entre 70 e 80 %. Contudo, com a adição de 15 ou 20 mg de resveratrol, os valores de recuperação nas NLS e NE reduziram drasticamente, enquanto mantiveram-se elevados para as ME. Essa redução observada na NLS e NE se deve a precipitação do RV, onde observou-se cristais do fármaco retidos no filtro de papel no momento da filtração destas dispersões. Entre os três tipos de carreadores, as NLS demonstraram uma menor capacidade de incorporar o resveratrol. De fato, as NLS têm demonstrado uma limitada capacidade de incorporar fármacos, seja devido à baixa solubilidade das substâncias na fase oleosa fundida, seja devido à formação de um cristal perfeito, após a solidificação das partículas, constituído de arranjos de lipídio altamente organizados, com poucas imperfeições que limitam o espaço para a acomodação das moléculas ou cristais de fármaco<sup>31,51,52</sup>. Por outro lado, para as microemulsões, os valores de recuperação elevados evidenciaram a elevada capacidade de tais sistemas em solubilizar fármacos hidrofóbicos. De fato, as microemulsões podem incorporar grandes quantidades de fármacos devido à alta capacidade de solubilização<sup>53</sup>. De acordo com os resultados, o teor máximo de resveratrol encontrado nas dispersões coloidais foi de cerca de 350, 415 e 852  $\mu\text{g/mL}$ , para as NLS, NE e ME, correspondendo a 7, 8,3 e 17% de fármaco em relação à massa de lipídio empregada nas formulações. Considerando a solubilidade aquosa do resveratrol que é de unicamente 0,03 mg/mL, a

obtenção das microemulsões permitiu o aumento da concentração deste fármaco em até 28,4 vezes, podendo esta concentração ainda ser maior, visto que a adição de quantidades iniciais maiores de resveratrol não foram testadas.

**Tabela 4.** Resultados de teor e recuperação do resveratrol nas dispersões coloidais de nanocarreadores lipídicos (n = 3).

Quantidade inicial de resveratrol		Teor de resveratrol ( $\mu\text{g/mL}$ )*	Recuperação (%)
5 mg	NLS <sub>rv</sub>	$186,9 \pm 14,9^a$	$74,76 \pm 5,95$
	NE <sub>rv</sub>	$190,1 \pm 12,4^a$	$79,04 \pm 0,85$
	ME <sub>rv</sub>	$199,0 \pm 8,0^a$	$79,93 \pm 3,20$
10 mg	NLS <sub>rv</sub>	$350,7 \pm 19,4^b$	$70,15 \pm 3,87$
	NE <sub>rv</sub>	$415,2 \pm 20,3^c$	$83,05 \pm 4,06$
	ME <sub>rv</sub>	$412,2 \pm 13,5^c$	$82,45 \pm 2,69$
15 mg	NLS <sub>rv</sub>	$212,1 \pm 9,6^a$	$28,28 \pm 1,29$
	NE <sub>rv</sub>	$338,8 \pm 20,2^d$	$45,17 \pm 2,69$
	ME <sub>rv</sub>	$619,3 \pm 25,2^e$	$82,03 \pm 3,36$
20 mg	NLS <sub>rv</sub>	$206,3 \pm 35,4^a$	$20,63 \pm 3,54$
	NE <sub>rv</sub>	$327,0 \pm 6,0^d$	$32,70 \pm 0,60$
	ME <sub>rv</sub>	$852,8 \pm 3,46^f$	$85,28 \pm 0,35$

\* Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias (p < 0,001).



**Tabela 5.** Resultados da análise da variança realizada para avaliar o efeito do nanocarreador e da quantidade inicial de resveratrol sobre o teor de fármaco nas dispersões coloidais.

Origem da variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F <sub>calculado</sub>	F <sub>crítico</sub> *
Tipo do nanocarreador	504294,5	2	252147,2	785,2	3,40
Quantidade inicial de resveratrol	363922,7	3	121307,5	377,7	3,00
Interação	467852,3	6	77975,3	242,8	2,50
Dentro dos grupos	7706,8	24	321,1		
Total	1343776,4	35	38393,6		

GL – Graus de liberdade      \*  $\alpha = 0,05$ .

O teor de resveratrol também foi investigado após a incorporação da HEC nas dispersões coloidais. Os valores encontrados nos nanogéis foram de  $359,2 \pm 23,8$ ,  $430,1 \pm 18,4$  e  $425,7 \pm 20,2$  para NLS<sub>rv</sub>, NE<sub>rv</sub>, e ME<sub>rv</sub>, respectivamente, quando 10 mg de resveratrol foi adicionado às formulações. Para as microemulsões (ME<sub>rv</sub>) preparadas com uma quantidade inicial de 15 e 20 mg, os valores foram de  $637,8 \pm 22,9$  e  $859,2 \pm 6,1$  µg/mL respectivamente. Estes valores foram similares aos encontrados nas dispersões coloidais, conforme demonstrado na Tabela 4.

As fotomicrografias obtidas a partir dos filmes formados a partir dos nanogéis encontram-se demonstradas na Figura 3. A presença de partículas dispersas na matriz polimérica da HEC pode ser observada em todas as amostras analisadas. Entretanto, diferenças na morfologia das partículas podem ser verificadas nas micrografias. Enquanto os filmes contendo a nanoemulsão e a microemulsão exibem estruturas de formato esférico, o filme contendo nanopartículas lipídicas sólidas é caracterizado por apresentar partículas com faces quadradas,

característico de sistemas isométricos cúbicos. Isto provavelmente decorre do fato da nano e microemulsão serem formadas a partir de um lipídio líquido (óleo de rícino), enquanto que a nanopartícula lipídica sólida é formada a partir de um lipídio sólido a temperatura ambiente, em que as moléculas do mesmo são dispostas de maneira mais organizada na estrutura da partícula.

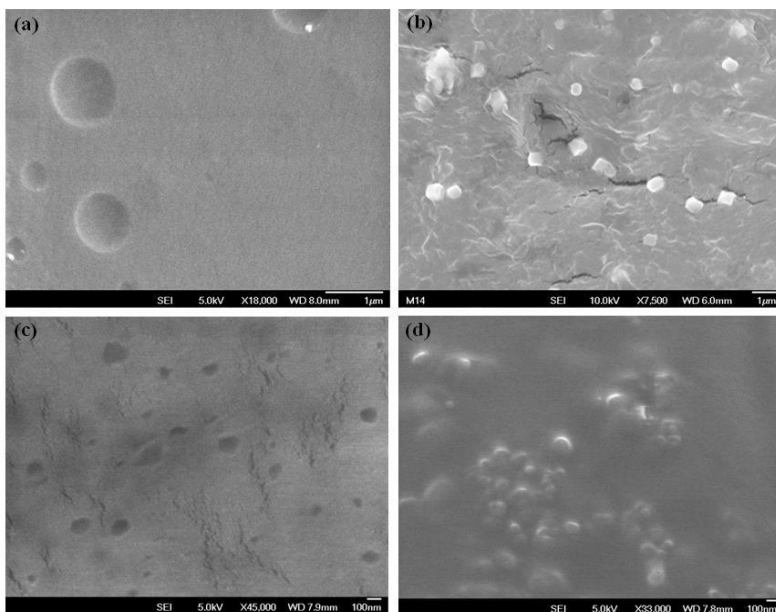
As análises reológicas dos géis nos diferentes nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol e do gel puro (sem nanocarreadores) apresentaram fluxos não-newtoniano, em que a viscosidade dependeu da tensão de cisalhamento aplicada (Tabela 6). Nestes resultados pode ser observada a redução da viscosidade dos nanogéis com o aumento da tensão de cisalhamento, sendo característico de fluidos que apresentam comportamento pseudoplástico. Por outro lado, é possível notar o aumento da viscosidade dos géis contendo os nanocarreadores lipídicos em relação ao gel puro, sendo que o aumento mais pronunciado ocorreu com nos géis contendo NLS, provavelmente devido à presença de partículas sólidas na preparação. Eles contrastam com estudos reológicos realizados após a incorporação de nanoemulsões em géis de ácido acrílico, em que a redução da viscosidade do gel ocorreu após a adição do nanocarreador. Estes resultados indicam, portanto, que não somente o tipo do agente gelificante, mas também o tipo de nanocarreador são determinantes nas propriedades reológicas do produto final. Entretanto, estudos mais aprofundados são ainda necessários para compreender as interações existentes entre agente gelificante e nanocarreador.

**Tabela 6.** Resultados obtidos na caracterização do gel de HEC puro e dos nanogéis.

Velocidade de rotação (rpm)	Gradiente de cisalhamento (s <sup>-1</sup> )	Gel de HEC puro		Nanogel-NLS		Nanogel-NE		Nanogel-ME	
		$\tau$ (D/cm <sup>2</sup> )	$\eta$ (cP)	$\tau$ (D/cm <sup>2</sup> )	$\eta$ (cP)	$\tau$ (D/cm <sup>2</sup> )	$\eta$ (cP)	$\tau$ (D/cm <sup>2</sup> )	$\eta$ (cP)
5	6,6	6,2	94,2	9,3	141,6	6,9	104,4	7,21	109,2
10	13,2	12,6	95,4	17,6	133,8	13,5	102,6	13,8	104,4
15	26,2	25,0	94,8	33,7	127,8	26,5	100,3	26,9	102,0
20	39,6	38,8	93,0	nd	nd	39,9	98,4	39,2	99,8

nd: não determinado; Torque > 100%.

$\tau$  - tensão de cisalhamento,  $\eta$  – viscosidade



**Figura 3.** Fotomicrografias dos filmes obtidos a partir dos nanogéis de HEC obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG). (a) Gel branco (b) nanogel de NLS (c) nanogel de NE (d) nanogel de ME.

## CONCLUSÃO

NLSs, NEs e MEs contendo resveratrol foram obtidas por um método simples de formação de emulsão e difusão do solvente a quente, variando somente a composição da formulação. O método de CLAE desenvolvido para quantificar o resveratrol nas dispersões e nanogéis demonstrou ser específico, linear, exato e preciso. Apesar de valores elevados de eficiência de encapsulação terem sido obtidos para todas as formulações, o teor de resveratrol variou significativamente em função do tipo de carreador e da quantidade inicial de fármaco adicionado na fase orgânica da preparação. Dentre os três tipos de nanocarreadores lipídicos, as MEs exibiram uma maior capacidade de incorporar o resveratrol, sendo a concentração final na dispersão foi cerca de 28 vezes maior que a solubilidade aquosa do mesmo. A incorporação de HEC na fase aquosa das dispersões coloidais proporcionou a obtenção de sistemas pseudoplásticos. A presença dos nanocarreadores conduziu ao aumento da viscosidade do gel de HEC, sobretudo quando as NLSs foram empregadas. Os resultados indicaram que as dispersões coloidais lipídicas obtidas neste estudo podem potencialmente ser exploradas como carreadores para administração tópica do resvetrarol, atuando como um reservatório de fármaco após aplicação do gel sobre a pele.

## REFERÊNCIAS

1. Ignatowicz, E.; Baer-Dubowska W.; *Pol J Pharmaco.* **2001**, 53, 557.
2. Burns, J.; Yokota, T.; Ashihara, H.; Lean, M.E.J.; Crozier, A; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3337.
3. Fulda, S.; Debatin, K.M.; *Cancer Detect and Prev.* **2006**, 30: 217–223.
4. Yu, C.; Shin, Y.G.; Chow, A.; Li, Y.; Kosmeder, J.W.; Lee, W.S.; Hirschelman, W.H.; Pezzuto, J.M.; Mehta, R.G.; Van Breemen, R.B.; *Pharm Res.* **2002**, 19, 1907.
5. Vitrac, X.; Desmoulière, A.; Brouillaudc, B.; Krisa, S.; Deffieux, G.; Barthe, N.; Rosenbaumb, J.; Mérillon, J.M.; *Life Sci.* **2003**, 72, 2219.
6. Shankar, S.; Singh, G.; Srivastava, R.K.; *Front Biosci.* **2007**, 12, 4839.
7. Ulrich, S.; Wolter, F.; Stein, J.M.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 452.
8. Gusman, J.; Malonne, H.; Atassi, G.; *Carcinogenesis*, **2001**, 22, 1111.
9. Asensi, M.; Medina, I; Ortega, A.; Carretero, J.; Baño, M.C.; Obrador, E.; Estrela, J.M.; *Free Radic Biol Med.* **2002**, 33, 387.
10. Gautam, S.C.; Xu, Y.X.; Dumaguin, M.; Janakiraman, N.; Chapman, R.A.; *Bone Marrow Transplant.* **2000**, 25, 639.
11. Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M.; *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, 61, 549.
12. Rastija, V.; Medic-Saric, M.; *Eur J Med Chem.* **2009**, 44, 400.
13. Olas, B.; Wachowicz, B.; *Platelets.* **2005**, 16, 251.
14. Jung, H.J.; Seu, Y.B.; Lee, D.G.; *J Microbiol Biotechnol.* **2007**, 17, 1324.
15. Martín, A.R.; Villegas, I.; Sánchez-Hidalgo, M.; Lastra, C.A; *Br J Pharmacol.* **2006**, 147, 873.

16. Gusman, J.; Malonne, H.; Atassi, G.; *Carcinogenesis*. **2001**, 22, 1111.
17. Athar, M.; Back, J.H.; Tang, X.; Kim, K.H.; Kopelovich, L.; Bickers, D.R.; Kim, A.L.; *Toxicol Appl Pharmacol*. **2007**, 224, 274.
18. Stivala, L.A.; Savio, M.; Carafoli, F.; Perucca, P.; Bianchi, L.; Maga, G.; Forti, L.; Pagnoni, U.M.; Albinii, A.; Prosperi, E.; Vannini, V.; *J Biol Chem*. **2001**, 276, 22586.
19. Williamson, G.; Manach, C.; *Am J Clin Nutr*. **2005**, 81, 243S.
20. Walle, T.; Hsieh, F.; Delegge, M.H.; Oatis Jr.; J.E.; Walle, U.K.; *Drug Metab Dispos*. **2004**, 32, 1377.
21. Wenzel E.; Somoza, V.; *Mol Nutr Food Res*. **2005**, 49, 472.
22. Piñeiro, Z.; Palma, M.; Barroso, C.G.; *J Chromatogr A*. **2006**, 1110, 61.
23. Janga, M.; Pezzuto, J.M.; *Cancer Lett*. **1998**, 134, 81.
24. Soleas, G.J.; Grassc, L.; Josephyd, P.D.; Goldberg, D.M.; Diamandis, E.P.; *Clin Biochem*. **2002**, 35, 119.
25. Aziz, M. H.; Afaq, F.; Ahmad, N.; *Photochem Photobiol*. **2005**, 81, 25.
26. Afaq, F.; Adhami, V.M.; Ahmad, N.; *Toxicol Appl Pharmacol*. **2003**, 186, 28.
27. Chan, M. M.; *Biochem Pharmacol*. **2002**, 63, 99.
28. Docherty, J.J.; Smith, J.S.; Fu, M.M.; Stoner, T.S.; Booth, T.; *Antiviral Res*. **2004**, 61, 19.
29. Hung, C. F.; Lin, Y.K.; Huang, Z.R.; Fang, J.Y.; *Biol Pharm Bull*. **2008**, 31, 955.
30. Wang, J.X.; Sun, X.; Zhang, Z.R.; *Eur J Med Chem*. **2002**, 54, 285.
31. Wissing, S.A.; Kayser, O.; Müller, R.H.; *Adv Drug Deliv Rev*. **2004**, 56, 1257.

32. Manjunath, K.; Reddy, S.J.; Venkateswarlu, V.; *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* **2005**, 27, 127.
33. Vicentini, F.T.M.C.; Simi, T.R.M.; Del Ciampo, J.O.; Wolga, N.O.; Pitol, D.L.; Iyomasa, M.M.; Bentley, M.V.L.B.; Fonseca, M.J.V.; *Eur J Med Chem.* **2008**, 69, 948.
34. Shishu, S.; Rajan; Kamalpreet; *AAPS PharmSciTech.* **2009**, 10, 559.
35. Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I.; *J Agric Food Chem.* **2003**, 51, 5226.
36. Quirós, A.R.B.; López-Hernández, J.; Ferraces-Casais, P.; Lage-Yusty, M.A.; *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 1262.
37. Wang, D.; Xu, Y.; Liu, W.; *Phytomedicine.* **2008**, 15, 859.
38. He, H.; Chen, X.; Wang, G.; Wang, J.; Davey, A.K.; *J Chromatogr B.* **2006**, 832, 177.
39. Hu, F.; Jiang, S.; Du, W.; Yuan, H.; Ye, Y.; Zeng, S.; *Int J Pharm.* **2006**, 314, 83.
40. *International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH-Q2 (R1)*, November (2005), Geneva, Switzerland.
41. *U.S. Pharmacopeia*, 23rd Ed., U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 1995.
42. Purdon, C.H.; Azzi, C.G.; Zhang, J.; Smith, E.W.; Maibach, H.I.; *Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst.* **2004**, 21, 97.
43. Rizwan, M.; Aqil, M.; Talegaonkar, S.; Azeem, A.; Sultana, Y.; Ali, A.; *Recent Pat Drug Deliv Formul.* **2009**, 59, 427.
44. Bouwstra J.A.; Honeywell-Nguyen, P.L.; *Adv Drug Deliv Rev.* **2002**, 54, S41.
45. Schäfer-Korting, M.; Mehnert, W.; Korting, H.C.; *Adv Drug Del Rev.* **2007**, 59, 427.

46. Hu, F.Q.; Yuan, H.; Zhang, H.H.; Fang, M.; *Int. J. Pharm.* **2002**, 239, 121.
47. Dora, C.L.; Silva, L.F.C.; Soldi, V.; Pignot-Paintrand, I.; Borsali, R.; Lemos-Senna, E.; Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Copenhagen, Dinamarca, 2009.
48. Subedi, R.K.; Kang, K.W.; Choi, H.K.; *Eur J Pharm Scie.* **2009**, 37, 508.
49. Yin, Y.M.; Cui, F.D.; Mu, C.F.; Choi, M.K.; Kim, J.S.; Chung, S.J., Shim, C.K., Kim, D.D. *J Control Release.* **2009**, 140, 86.
50. Zhou, H.; Yue, Y.; Liu, G.; Li, Y.; Zhang, J.; Gong, Q.; Yan, Z.; Duan, M. *Nanoescale Res Lett.* **2009**.
51. Westesen, K.; Bunjes, H.; Koch, M.H.J.; *J Control Release.* **1997**, 48, 223.
52. Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M.J.; Torres, D.; *J Colloid Interface Sci.* **2005**, 285, 590.
53. Nazar, M.Z.; Khan, A.M.; Shah, S.S.; *AAPS PharmSciTech.* **2009**, 10, 1286.



---

**CAPÍTULO 3: SKIN  
PENETRATION STUDIES OF RESVERATROL  
INCORPORATED INTO LIPID-BASED NANOCARRIERS**

---



*A administração cutânea de fármacos tem sido considerada uma via não-invasiva que exhibe inúmeras vantagens sobre as outras vias de administração. Entretanto, a administração cutânea ainda é um desafio na área farmacêutica, visto que o estrato córneo impõe uma barreira à passagem de fármacos, dificultando o alcance do mesmo nas diferentes camadas da pele. Diferentes estratégias têm sido testadas com o objetivo de romper a barreira imposta pela camada córnea e aumentar a passagem de fármacos através da pele, incluindo o emprego de sistemas nanoestruturados lipídicos (PURDON et al., 2004; RIZWAN ET AL., 2009). Estes sistemas além de melhorar a absorção cutânea, podem vetorizar o fármaco para estratos e estruturas específicas da pele (BORGIA et al., 2005; MANDAWGADE & PATRAVALE, 2008).*

*Para delinear sistemas de liberação por via cutânea, é essencial compreender os princípios de incorporação do fármaco nos nanocarreadores e suas consequências na permeação através da pele (BORGIA et al., 2005). O resveratrol, um composto polifenólico, pode ser um bom candidato a nanoencapsulação, visto que este composto apresenta baixa solubilidade aquosa, além de apresentar inúmeras atividades farmacológicas. Baxter (2008) revisou formulações contendo RV destinadas aos cuidados da pele no fotoenvelhecimento. Em outro estudo, os autores demonstraram a capacidade do RV em inibir a atividade antimicrobiana e antifúngica dos principais agentes etiológicos causadores de infecções na pele (CHAN, 2002). Este composto ainda apresentou atividade quimiopreventiva contra a exposição da pele por UVB (AZIZ et al., 2005)*

*Assim, este trabalho avaliou a capacidade de diferentes sistemas nanoestruturados lipídicos, constituídos de NLS, NE e ME, em dispersão e em nanogéis, em liberar o resveratrol através da pele. Para tal, estudo de permeação e retenção cutânea in vitro foram realizados usando o modelo bicompartimental de células de difusão tipo Franz, e pele de orelha suína, como modelo de membrana. Estes resultados são apresentados em forma de um artigo científico a ser submetido ao International Journal of Pharmaceutics.*



**Skin penetration studies of resveratrol incorporated into lipid-based  
nanocarriers**

Daiane Nemen, Elenara Lemos-Senna\*

*Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências  
Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de  
Santa Catarina, Campus Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900,  
Brazil*



## Introduction

Topical treatment of skin diseases displays a number of advantages comprising the avoidance of the first passage metabolism in the liver, the delivery of drugs directly to the location to be treated, the reduction of the systemic side effects as compared to parenteral or oral drug administration, and the enhancement of the therapeutic efficacy with maximum comfort to the patients. However, drug topical administration is still a challenge in pharmaceuticals due to the very efficient barrier function exerted by the horny layer, which impairs absorption of most of drugs (Bouwstra et al., 2003; Schäfer-Korting et al., 2007). Different approaches have been used to enhance skin permeation and bioavailability, and it comprises the use of chemical or physical enhancers. Drug delivery systems have gained great attention in the last years, since they allow delivering drugs selectively and over a prolonged time course in the skin. In particular, colloidal drug carriers have demonstrated not only enhance percutaneous absorption but also to target drugs to the skin or even to its substructures (Schäfer-Korting et al., 2007).

Colloidal drug carriers might differ in materials, composition, drug loading, and application range, but the characteristic they share is their submicron particle size. Besides their targeting properties, such systems provide drug protection from degradation and allow the control of drug release (Hauss, 2007; Pouton and Porter, 2008). Several polymeric materials have been employed in the preparation of colloidal suspensions of nanoparticles. However, over the last two decades considerable attention has been given to the development of lipid-based nanocarriers, in particular for the administration of poorly water-soluble drugs. Their many advantages over polymer-based drug delivery systems are their excellent physical stability, excellent stability, excellent tolerability, and feasibility of scaling up production (Wissing et al., 2004). Lipid-based colloidal carriers can be comprised by solid or liquid lipids, or mixtures of them, in several ratios, and can be obtained by different techniques. The use of highly purified lipids, combined to the selected surfactants, can lead the formation of matrix or reservoir drug delivery systems displaying a great range of particle sizes. Regarding to their structural features, lipid-based nanocarriers resemble oil-in-water emulsions, but with the internal phase being small in size and displaying a liquid or solid consistency (Chakraborty et al., 2009).

Even that it had not been completely clarified, some reasons have been proposed to explain the skin enhance properties of lipid colloidal drug carriers. The drug is presented in a dissolved or finely dispersed form, in which the small particle size ensures close contact with the stratum corneum, facilitating drug transport. The nanocarriers may to accumulate into hair follicles or in wider spaces between corneocytes clusters or furrows, where they can intermingle with skin lipids, having a positively influence on drug permeation. Lipids nanocarriers can also disintegrated or merge/fuse on skin surface into extent lipid structures as lipid lamellae that indirectly enhance skin permeation by an occlusion effect. Finally, some of nanocarriers components, specially surfactants, are known to be skin permeation enhancers, reducing skin barrier to diffusion (Alves et al., 2007; Schäfer-Korting et al., 2007; Lv et al., 2009; Cevc and Vierl, 2010).

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a naturally polyphenolic compound found in a considerable amounts in grapes and red wine (Fulda and Debatin, 2006). Several studies have demonstrated the beneficial properties of this compound to health, including quimiopreventive (Ulrich et al., 2005), antioxidant (Rastija and Medic-Saric, 2009), antimicrobial (Jung et al., 2007), antiviral (Docherty et al., 2004), anti-inflammatory (Martín et al, 2006) and cardioprotective properties (Das and Maulik, 2006). Some studies have also evidenced the potential use of this compound to treat skin disorders. Resveratrol displayed chemopreventive effects against UVB exposure-mediated skin carcinogenesis, which appeared to be mediated by the downregulation of the survivin, a protein of the IAP family that is over expressed in the tumor cells and it has been related to the cell proliferation (Afaq et al., 2003; Aziz et al., 2005). Resveratrol exhibited antimicrobial activity against bacteria and dermatophytes that are major etiologic agents of human skin infections (Chan, 2002). The development of herpes simplex virus induced skin lesions was also inhibited after topical application of a resveratrol cream, which displayed a similar effectiveness as compared with acyclovir cream, a well established antiviral agent (Docherty et al., 2004).

Recently, we have demonstrated that solid lipid nanoparticles (SLN), nanoemulsions (NE), microemulsion (ME) can be obtained by the hot solvent diffusion method, by changing only the formulation composition. These colloidal dispersions were prepared using tristearin or castor oil as oily phase, and phosphatidylcholine and 12-



hydroxystearic ethoxylated as surfactants. The colloidal dispersions differ among them basically in terms of particle size, inner structure, and surfactant concentration. Also, the colloidal dispersions exhibited different abilities to incorporate resveratrol. In this study we are interested in to evaluate and compare the ability of these lipid-based nanocarriers in to deliver resveratrol through the skin. Hydrogels were obtained from the colloidal dispersions and were also assayed in the skin penetration studies. Besides the attempt to have an understanding of the main properties of the lipid-based nanocarriers that promote skin penetration of drugs, the present study also intends to obtain an optimized lipid formulation containing resveratrol for the treatment of cutaneous disorders.

## 2. Experimental

### 2.1 Materials

Resveratrol was purchased from Sigma (St. Louis, USA), castor oil and Lecithin S75-3N<sup>®</sup> were purchased from Via Pharma (São Paulo, Brazil) and SP Pharma (São Paulo, Brazil), respectively. Tristearin (Dynasan 118<sup>®</sup>) was kindly donated by Sasol (Louisiana, USA) and 12-hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (Solutol HS-15<sup>®</sup>) was donated by Basf (Trostberg, Germany). Hydroxyethylcellulose (HEC) (Natrosol<sup>®</sup>) was purchased from Denver-Cotia (São Paulo, Brazil). Ultra-pure water was provided by a Milli-Q<sup>®</sup> purification system (Millipore, Bedford, USA). Methanol of HPLC grade was purchased from J.T Baker<sup>®</sup> (Phillipsburg, USA). Ethanol, acetone and other chemicals used were of analytical reagent grade.

### 2.2. Preparation of the lipid nanocarriers suspensions

The resveratrol-loaded lipid based nanocarriers were prepared by a hot solvent diffusion method (HU et al., 2006). Briefly, lecithin, tristearin (TS) or castor oil (CO), and resveratrol were completely dissolved into a mixture of acetone:ethanol (60:40, v/v) at 60°C. The resulting organic solution was quickly poured into 50 mL of an aqueous solution containing Solutol HS15<sup>®</sup>, maintained under magnetic stirring at 82°C. The resulting colloidal dispersions were then cooled to room

temperature, the organic solvent was evaporated under reduced pressure, and the final volume was adjusted to 20 mL. Finally, the colloidal dispersions were filtered through an 8 µm filter paper. The resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles, nanoemulsions and microemulsions obtained were named as RV-SLN, RV-NE, and RV-ME, respectively. The qualitative and quantitative composition of the formulations was demonstrated in Table 1. Blank colloidal dispersions were prepared using the same conditions, as it was needed. The formulations were stored at 4 °C before use.

**Table 1.** Formulation composition of resveratrol-loaded lipid-based colloidal dispersions

	TS	Oily phase			Aqueous phase
	(mg)	CO	Lecithin	RV (mg)	Solutol HS15
	(mg)	(mg)	(mg)		(%)
RV-SLN	100		20	10	0.1
RV-NE	-	100	20	10	0.1
RV-ME1	-	100	10	10	1.0
RV-ME2	-	100	10	15	1.0
RV-ME3	-	100	10	20	1.0

TS – Tristearin / CO – Castor oil

### 2.3. Preparation of hydrogels containing resveratrol-loaded lipid-based nanocarriers

Hydrogels containing the resveratrol-loaded lipid nanocarriers (nanogels) were obtained by adding 0.3 g of hydroxyethylcellulose (Natrosol®) into the aqueous phase of the colloidal dispersions. The mixtures were kept under magnetic stirring for 12 hours at room temperature. The nanogels were stored at 4 °C before use.

### 2.4. Characterization of colloidal dispersions and nanogels

#### 2.4.1 Determination of Particle Size and Zeta Potential

The mean particle diameter and zeta potential were determined by photon correlation spectroscopy and laser-Doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The measurements were taken at 25 °C after appropriate dilution of the samples in distilled water. Each size analysis

lasted 120 s and was performed with an angle detection of 173°. For measurements of zeta potential, lipid nanocarriers samples were placed in an electrophoretic cell, where a potential of  $\pm 150$  mV was established. The potential values were calculated from mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation.

#### *2.4.2. Determination of resveratrol in the colloidal dispersions and nanogels*

##### *2.4.2.1 Sample preparation*

For HPLC analysis, an aliquot of each colloidal dispersions or nanogel was quantitatively transferred to a 10.0 mL volumetric flask and the final volume was completed with methanol. Next, the samples were centrifuged and an aliquot of the supernatant was diluted with a solution of water:methanol (53:47, v/v). The samples were filtered through a 0.45  $\mu$ m pore size cellulose membrane filter and analyzed by HPLC.

##### *2.4.2.2. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis*

The resveratrol content in the nanocarriers dispersions was determined by a high performance liquid chromatography method, and it was performed using a Perkin Elmer S200 system (Shelton, USA) equipped with a vacuum degasser series 200, auto sampler series 200, a binary pump series 200, a UV/VIS detector series 200, and a chromatography interface 600 Series LINK. The detector was set at 312 nm and peak areas were integrated automatically by computer using the Totalchrom software program. The experiments were carried out using a reversed-phase Zorbax ODS C<sub>18</sub> column (Agilent Technologies, USA) (150 mm x 4.6 mm I.D., with a particle size of 5  $\mu$ m), maintained at 24  $\pm$  1 °C. The mobile phase was constituted of a water:methanol mixture (53:47 v/v) and was eluted isocratically at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup>.

The HPLC method for resveratrol determination in the colloidal dispersions and nanogels was previously validated. The detector response was found to be linear at the concentration range from 0.4 to 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9999$ ). The limits of detection and limits of quantitation were 0.09  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and 0.26  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> respectively, indicating the sensitivity of the method. The specificity of the assay was confirmed

by the individual analysis of the blank lipid-based nanocarriers and nanogels. Accuracy and precision of the method were evaluated and all relative standard deviation (R.S.D) were below 2%.

### *2.5. Determination of the resveratrol partition coefficient*

To determine the n-octanol/water partition coefficient of resveratrol, equal portions (2 mL) of water and n-octanol were mixed for 24 h in a closed amber vial to achieve equilibrium at room temperature. An excess of resveratrol was added to a 0.5 mL aliquot of each phase, and the mixtures were kept under stirring for 12 h at room. The samples were centrifuged at 10,000 rpm during 15 min and after, a 0.1 mL aliquot of each phase was withdrawn and diluted in water:methanol (53:47 v/v) solution. The samples were then analysed by HPLC, as described below. The partition coefficient (log P) was calculated by the logarithm of the quotient between the saturation concentration of resveratrol ( $\mu\text{g/mL}$ ) in the n- octanol and aqueous phases, respectively. The experiment was carried out in triplicate.

### *2.6. In vitro skin penetration studies*

#### *2.6.1 Preparation of skin samples*

*In vitro* skin permeation studies were carried out using pig ear skin as membrane model. Pig ears were obtained from a slaughterhouse located at Antônio Carlos City (Santa Catarina, Brazil) within 2 h after animal slaughter. The whole skin membrane was carefully removed from the underlying cartilage with a scalpel. The subcutaneous tissues were removed and the skin was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  before use.

#### *2.6.2. In vitro permeation studies*

Resveratrol permeation was assessed using the Franz's bicompartamental diffusion cells presenting a nominal diffusion area of  $2.35\text{ cm}^2$  and a receptor volume of 10 mL. Prior the use, the skin specimens were defrosted and the remaining blood vessels and exceeding fat were removed with a clamp to obtain skin samples with

homogeneous thickness (approximately 1 mm). Next, the skin samples were hydrated by placing them in isotonic phosphate buffer (pH 7.4) overnight in a refrigerator (at 4 °C). Before use the phosphate buffer was replaced by a solution ethanol:water (50:50, v/v), which was used as receptor phase to assure sink conditions. Following, excised circular pig ear skin was set between the donor and receptor compartments, with the stratum corneum facing the donor compartment and the dermis facing the receptor compartment. An aliquot of each resveratrol-loaded nanocarrier dispersion (RV-SLN, RV-NE or RV-ME), and their respective nanogels containing 200 µg of drug were placed on the skin surface in the donor chamber. In order to evaluate the effect of drug payload of microemulsions on permeation, RV-ME suspensions and RV-ME nanogels containing 310 µg and 435 µg of resveratrol were also assayed using the same conditions. All formulations were applied without occlusion and water was allowed to evaporate. The receptor medium of diffusion cells were maintained at controlled temperature ( $37 \pm 1.0$  °C) under magnetic stirring. At given time intervals (0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 h) aliquots of 200 µL were collected and the same volume of fresh solution ethanol:water (50:50, v/v) was replaced. Blank colloidal suspensions or nanogels were assayed using the same conditions to be used as reference in the validation of the analytical measurements. The samples were directly analyzed by HPLC and the results were expressed as amount of drug permeated by area (µg/cm<sup>2</sup>). The permeation flux ( $J_{ss}$ ) (µg cm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) was determined graphically, through the slope of the linear portion, and the latency time (h) of the diffusion was determined through the intersection with the x axis, when the permeated resveratrol amount by skin area was plotted as function of time. The permeability coefficient ( $k_p$ ) was calculated using the following equation:

$$k_p = \frac{J_{ss}}{c}$$

where  $c$  is the initial concentration of drug in the samples applied to the donor phase.

### 2.6.3. *In vitro* retention studies

At the end of the *in vitro* permeation study, the skin was removed from the diffusion cell, washed with distilled water and wiped with a cotton swab to remove the excess of the formulation. To guarantee that the drug excess was removed, layers of stratum corneum were removed by two pieces of adhesive tape for each sample. The skin was then cut into small pieces and placed into a vial. Drug extraction was performed after addition of 1 mL of methanol to the skin, followed by ultrasonication for 30 s and vortexation for 30 s. The mixture was centrifuged for 10 min at 5,000 rpm and the supernatant withdrawn. This procedure was repeated two times with the remaining tissue and the supernatants obtained after centrifugation were gathered in a 5.0 mL volumetric flask and the final volume was completed with distilled water. The skin extract was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane (Millipore HVLP) and analyzed by HPLC as described in 2.4.2.2. The specificity of the assay was guaranteed by analyzing the skin extracts before and after the application of blank lipid-based nanocarriers.

### 2.6.4. Statistical analysis

All the results are expressed as the mean value  $\pm$  the standard deviation of the mean and statistically analyzed by two-way variance analysis (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Characterization of the colloidal dispersions and nanogels

The physicochemical characteristics of the lipid-based nanocarriers used in this study are depicted in Table 2. The average sizes of the particles were 213, 113, and around 21 nm for RV-SLN, RV-NE, and RV-ME, respectively. No difference in the particle size was verified when blank colloidal suspensions were obtained (data not shown). The polydispersed values were below 0.25, indicating narrow size distribution of the particles and, consequently, good uniformity of particle size within the formulations. All developed lipid-based nanocarriers exhibited negative charge at the surface, which could be

explained by the accumulation of lecithin at the particle surface. RV-SLN and RV-NE displayed zeta potential values higher than  $|\zeta|$ , indicating that the stabilization of the colloidal suspensions was reached by electrostatic repulsion between the particles. However, zeta potential was reduced when the higher concentration of Solutol HS 15 was used to obtain microemulsions, probably due to the hiding effect of negative charges of lecithin provided by the polyethyleneglycol chains of this surfactant. In this case, the steric effect most likely contributed for stabilization of microemulsions. While SLN and NE were macroscopically characterized as milky suspensions, MEs obtained with higher concentration of Solutol HS 15 were clear and transparent.

The RV content of the lipid-based nanocarriers are also demonstrated in Table 2. As can be observed, RV content ranged from 370.7 to 852.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , depending on the lipid nanocarrier formulation. The different abilities of these lipid-based nanocarriers in to incorporate resveratrol was previously demonstrated. The lower resveratrol content of SLN was associated to the low solubility of this compound in the melted oily phase during preparation. Further, the use of solid lipids as tristearin leads the formation of particles displaying a well-organized arrangement of the lipid molecules, which restrains the accommodation of the drug inside the particles (Westesen et al., 1997; Garcia-Fuentes et al., 2003; Wissing et al., 2004). For NE, the liquid state of CO allowed holding a higher amount of RV. However, the highest resveratrol payloads were verified for the microemulsions. In that case, resveratrol content in the colloidal suspensions was increased with the increase of the drug amount initially added to the formulations without the presence of any precipitate. These results were in accordance to the great capacity of microemulsion systems in to solubilize hydrophobic drugs (Nazar et al., 2009).

Due to the low viscosity of dispersions, it could be assumed that they were not suitable for topical or dermal delivery systems. To manage with this drawback, one possibility would be incorporation the nanocarriers into hydrogels. In our case, the nanogel formulations were prepared by adding HEC directly into colloidal suspensions.

**Table 2.** Physicochemical characterization of lipid-based nanocarriers.

Formulation	Average Size (nm) (PI) <sup>a</sup>	Zeta Potential (mV)	Drug content ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
			Nanogel	Colloidal suspensions
<b>RV-SLN</b>	203.5 $\pm$ 9.0 (0.253 $\pm$ 0.02)	-34.1 $\pm$ 2.5	359.2 $\pm$ 23.8	350.7 $\pm$ 19.4
<b>RV-NE</b>	113.1 $\pm$ 4.9 (0.124 $\pm$ 0.01)	-39.3 $\pm$ 2.3	430.1 $\pm$ 18.4	415.2 $\pm$ 20.3
<b>RV-ME<sub>1</sub></b>	21.7 $\pm$ 0.5 (0.197 $\pm$ 0.02)	-18.1 $\pm$ 0.8	425.7 $\pm$ 20.2	412.2 $\pm$ 13.5
<b>RV-ME<sub>2</sub></b>	21.9 $\pm$ 0.8 (0.259 $\pm$ 0.03)	-17.0 $\pm$ 2.7	637.8 $\pm$ 22.9	619.3 $\pm$ 25.2
<b>RV-ME<sub>3</sub></b>	19.4 $\pm$ 0.4 (0.203 $\pm$ 0.03)	-17.0 $\pm$ 2.6	859.2 $\pm$ 6.1	852.8 $\pm$ 3.46

<sup>a</sup>In parenthesis: polydispersed index

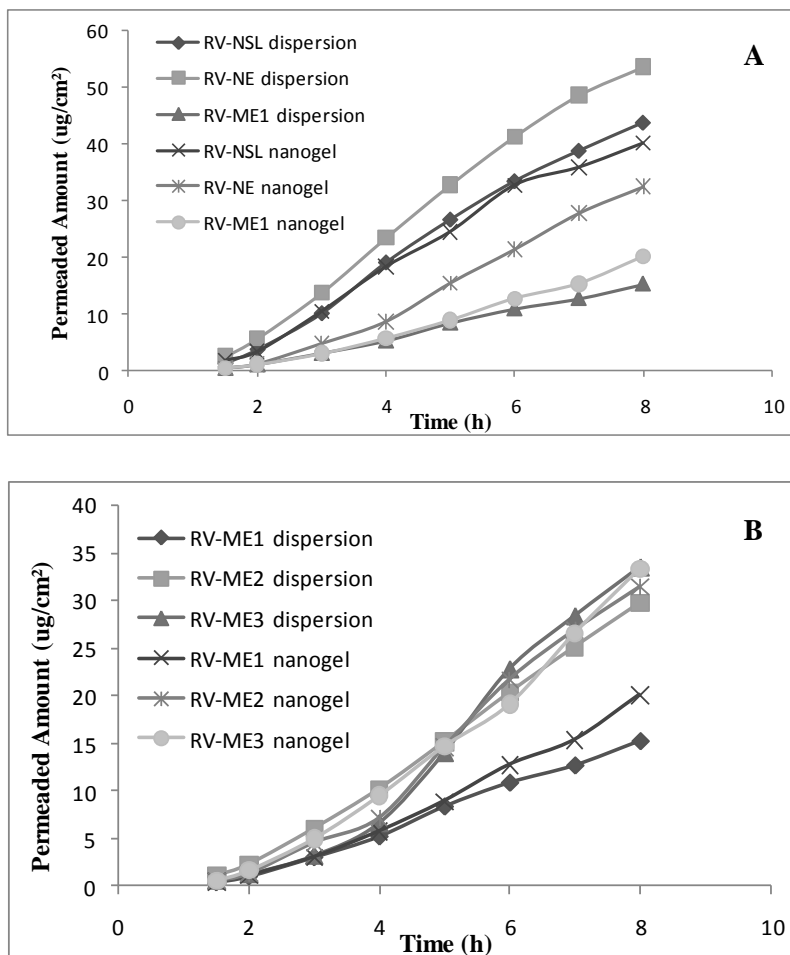
### 3.2. Determination of octanol–water partition coefficient

The o/w partition coefficient value is a useful parameter in order to understand the permeation behavior of substances through the skin. It is estimated that a therapeutic molecule should possess a log *P* equal or smaller than 2 to be a potential candidate for transdermal delivery, and higher log *P* value, tends to accumulate in the SC and, afterward, to be less available in the receptor compartment (PUGLIA et al., 2008). Resveratrol displayed a log *P* value of 2.57, which characterizes a lipophilic molecule with relative permeation capacity, tending to form reservoir in the stratum corneum and dermis lipid areas.



### 3.3. *In vitro* skin penetration studies

In order to verify the ability of the different lipid nanocarriers in delivering the resveratrol into the skin, before and after the formation of a hydrogel, *in vitro* permeation studies were carried out using Franz-type diffusion cells. For this experiment, an aliquot of each formulation, containing 200  $\mu\text{g}$  of resveratrol was placed in the donor compartment. Due to lipophilic characteristic of resveratrol, an ethanol:water solution 50:50 (v/v) was used the acceptor medium to achieve *sink* conditions. The permeation profiles of RV through pig ear skin after the application of the different lipid-based nanocarriers and nanogels are showed in Figure 1. A steady increase in the amount of permeated drug with time was observed for all formulations. After 8 h of experiment, the mean cumulative amounts of resveratrol permeated per unit area were 43.72, 53.68, and 15.24  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , from RV-SLN, RV-NE, and RV-ME dispersions, and 40.12, 32.36, and 20.07  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , from RV-SLN, RV-NE, and RV-ME nanogels, respectively. Already for ME 15.24, 29.76 and 33.49  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , from RV-ME<sub>1</sub>, RV-ME<sub>2</sub>, and RV-ME<sub>3</sub> dispersions, and 20.07, 31.48, and 33.32  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , from RV-ME<sub>1</sub>, RV-ME<sub>2</sub>, and RV-ME<sub>3</sub> nanogels, respectively. Table 3 shows the permeation parameters obtained from the permeated amount *versus* time graphs. As shown in Table 3, the resveratrol permeation rates and permeability coefficients were varied significantly among the three lipid-based nanocarrier dispersions. The resveratrol flux was increased in the following order: RV-NE > RV-SLN > RV-ME. The effect of the viscosity increasing of the colloidal dispersions on resveratrol permeation rate was only verified when RV-NE nanogel was assayed. On the other hand, latency time (h) was not affected by the type of the lipid-based nanocarrier suspension, but it was significantly increased for RV-NE nanogel, when compared with the respective colloidal dispersions.



**Fig. 1.** Permeation profiles of resveratrol through pig ear skin from (A) the different lipid-based nanocarriers and their respective nanogels, and (B) microemulsions and nanogels containing different resveratrol payloads.

**Table 3.** Permeation parameters of resveratrol across the skin obtained with different lipid-based nanocarriers.

		Flux ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Latency time (h)	$K_p$ ( $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1} \times 10^{-3}$ )
<b>RV-SLN</b>	<b>Dispersion</b>	$6.84 \pm 1.63^{a/b}$	$1.49 \pm 0.34$	$34.18 \pm 8.14^{a/b}$
	<b>Nanogel</b>	$6.27 \pm 1.10$	$1.41 \pm 0.42$	$31.36 \pm 5.49$
<b>RV-NE</b>	<b>Dispersion</b>	$10.76 \pm 1.74^b$	$1.44 \pm 0.24$	$49.54 \pm 13.02^b$
	<b>Nanogel</b>	$5.56 \pm 1.12^d$	$2.03 \pm 0.04^c$	$34.71 \pm 10.09^d$
<b>RV-ME<sub>1</sub></b>	<b>Dispersion</b>	$2.23 \pm 1.14$	$1.62 \pm 0.60$	$10.32 \pm 6.28$
	<b>Nanogel</b>	$3.12 \pm 0.50$	$1.96 \pm 0.10$	$15.58 \pm 2.48$

All data represents the mean of six experiments  $\pm$  S.D. (n = 6); <sup>a</sup> significantly lower ( $p < 0.05$ ) as compared to RV-NE colloidal dispersion, <sup>b</sup> Significantly higher ( $p < 0.001$ ) as compared to RV-ME colloidal suspension, <sup>c</sup> Significantly lower ( $p < 0.001$ ) as compared to the RV-NE colloidal dispersion, <sup>d</sup> Significantly higher ( $p < 0.01$ ) as compared the the RV-NE colloidal suspension.

In order to evaluated the effect of the drug loading of microemulsions on the resveratrol delivery thought the skin, microemulsions containing increasing amounts of resveratrol were assayed. The permeation profiles of RV through pig ear skin and the permeation parameters obtained from the permeated amount *versus* time graphs are demonstrate in Figure 1B and Table 4, respectively. The rate of resveratrol permeation seemed to increase with the increasing of the drug amount applied to the skin. However, difference statistically significant in the flux thought the skin was found only when the microemulsion containing the highest concentration of resveratrol (RV-ME<sub>3</sub>) was assayed. On the other hand, permeability coefficient remained unchanged. This result was quite to be expected, since the thermodynamic activity of the drug in the formulation is a significant driving force for its release and penetration into the skin. However, even though the permeation rate was increased with the increase of the resveratrol content in the microemulsion, all values were below that that obtained for RV-NE (Table 3), suggesting that other factors are

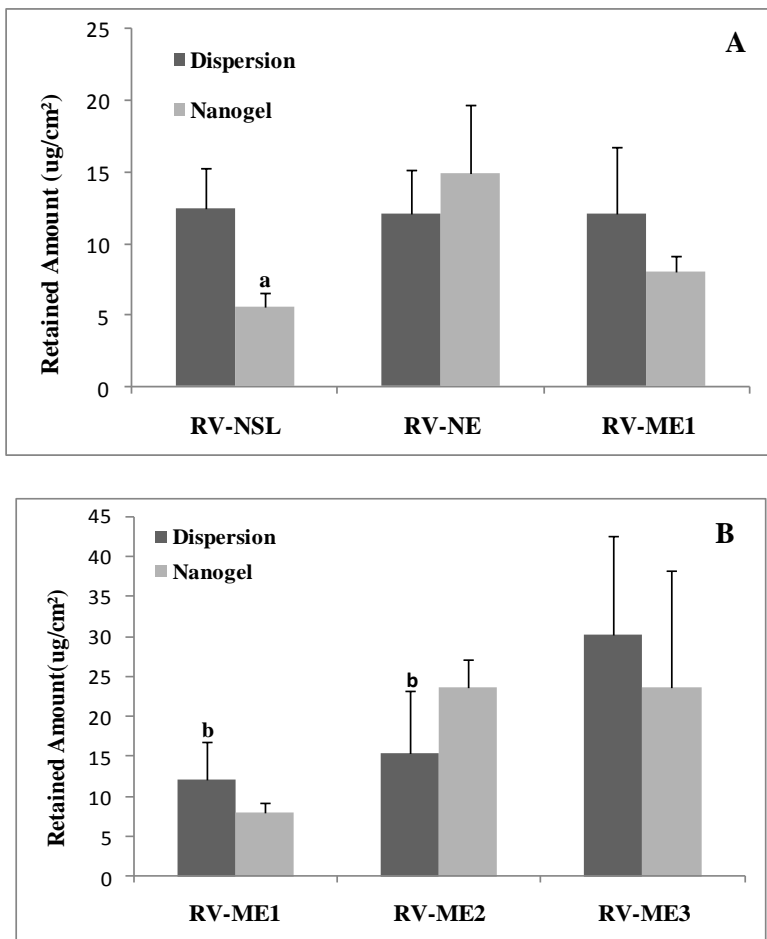
implicated on the ability of these lipid-based nanocarrier suspensions in to deliver resveratrol through the skin. In that case, the increase of the viscosity of ME formulations did not affect the resveratrol permeation rate or the latency time.

**Table 4** Permeation parameters of resveratrol across the skin obtained from microemulsions containing increasing resveratrol payloads.

		<b>Flux</b> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ )	<b>Latency time</b> (h)	<b>K<sub>p</sub></b> ( $\text{cm}/\text{h} \times 10^{-3}$ )
<b>RV-ME<sub>1</sub></b>	<b>Dispersion</b>	$2.23 \pm 1.14$	$1.62 \pm 0.60$	$10.32 \pm 6.28$
	<b>Nanogel</b>	$3.12 \pm 0.50$	$1.96 \pm 0.10$	$15.58 \pm 2.48$
<b>RV-ME<sub>2</sub></b>	<b>Dispersion</b>	$4.54 \pm 1.53$	$2.09 \pm 0.10$	$14.53 \pm 4.89$
	<b>Nanogel</b>	$5.44 \pm 1.44$	$2.23 \pm 0.32$	$17.37 \pm 3.59$
<b>RV-ME<sub>3</sub></b>	<b>Dispersion</b>	$6.68 \pm 2.12^{\text{a/b}}$	$2.59 \pm 0.39^{\text{a/b}}$	$14.40 \pm 4.95$
	<b>Nanogel</b>	$5.91 \pm 1.085$	$2.02 \pm 0.16$	$13.52 \pm 2.48$

All data represents the mean of six experiments  $\pm$  S.D. (n = 6). <sup>a</sup>Significantly higher ( $p < 0.01$ ) as compared to RV-ME<sub>1</sub>; <sup>b</sup> significantly higher ( $p < 0.05$ ) as compared to RV-ME<sub>2</sub>.

The results obtained after determination of skin retention of resveratrol are depicted in Fig. 2. The amount of resveratrol retained in the skin was not affected by the type of the lipid nanocarrier, and the effect of the increase of the viscosity on RV retention was only observed for RV-SLN nanogel ( $P < 0.01$ ). When microemulsions containing different resveratrol contents were assayed, statistically significant difference was observed for RV-ME<sub>3</sub> colloidal dispersion, when compared with RV-SLN and RV-NE colloidal suspensions.



**Fig. 2.** Skin retention of resveratrol from (A) different lipid-based nanocarriers and their respective nanogels, and (B) microemulsions and nanogels containing increasing resveratrol payloads. <sup>a</sup>Significantly different ( $p < 0.01$ ) as compared RV-SLN nanogel, <sup>b</sup>Significantly lower ( $p < 0.001$ ) as compared to the RV-ME<sub>3</sub> colloidal suspension.

Several nanocarrier features have demonstrated to contribute to the increase of drug permeation through the skin, including the ability to enhance drug solubility, the large surface area which allows the close contact with the corneocytes, the occlusive effect, and the permeation enhancer effect of the formulation components. In spite of the many evidences pointing out that nanocarriers are promising drug delivery systems for cutaneous application, comparative results concerning the ability of them to increase drug permeation are lacking and some of them are even contradictory. However, most of authors are in agreement that formulation composition greatly affects the drug skin permeation, not only due the contribution of the structural features of the nanocarriers, but also due to the enhancer properties of the surfactants used in the formulations. In our study, three types of lipid-based nanocarriers were obtained differing only in the surfactant concentration and type of lipid used to obtain a matricial or reservoir structure. Among them, nanoemulsions clearly demonstrated the better ability to enhance resveratrol permeation, in spite of to be obtained with a Solutol HS 15 concentration ten times lower than that used to prepare microemulsions. In addition, the permeated cumulative amount of resveratrol was higher from nanoemulsions, even when the RV-ME containing the highest resveratrol payload was assayed. One plausible reason for that is the ability of the oily phase of nanoemulsions to merge on skin surface into extent lipid structures, enhancing skin permeation by an occlusion effect. Maybe the high surfactant concentration of microemulsions forms a highly hydrophilic covering at the particle surface, restraining its contact with the lipids of the stratum corneum and, consequently, the drug diffusion.

Some authors have described that SLN are more efficient than nanoemulsions in to enhance drug permeation. It has been ascribed to the formation of a semisolid film that covers the skin after loss of the water from the colloidal dispersion, which, in turn, results in a crystal modification of the SLN matrix that induces drug expulsion and penetration (Borgia et al., 2005). In this study, nanoemulsions were also more efficient in to deliver resveratrol through the skin than SLN. However, even being statistically significant, the difference in the permeation rate between SLN and NE were not as high as those found between these colloidal dispersions and the microemulsions and, therefore, these results should be interpreted with caution.

## **Conclusion**

The present study demonstrated that SLN, NE, and ME have different abilities in to deliver resveratrol through the skin. In particular, microemulsions containing resveratrol were lesser efficient in to promote the drug penetration. It may be attributed to the high hydrophilic covering provided by polyethyleneglycol chains of Solutol HS 15 that restrains the close contact of the particles with the stratum corneum.

## References

- Afaq, F., Adhami, V.M., Ahmad, N., 2003. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 186, 28–37.
- Alves, M.P., Scarrone, A.L., Santos, M., Pohlmann, A.R.P., Guterres, S.S., 2007. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, 341, 215–220.
- Aziz, M.H., Reagan-Shaw, S., Wu, J., Longley, B.J., Ahmad, N., 2005. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J.*, 18.
- Borgia, S.L., Regehy, M., Sivaramakrishnan, R., Mehnert, W., Korting, H.C., Danker, K., Roder, B., Kramer, K.D., Schäfer-Korting, M., 2005. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *J. Control. Release*, 110, 151–163.
- Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyena, P.L., Gooris, G.S., Ponc, M., 2003. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog. Lipid Res.*, 42, 1–36.
- Cevc, G. and Vierl, U., 2010. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J. Control. Release*, 141, 227-299.
- Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., Singh, S., 2009. Lipid: an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 73,1-15.
- Chan, M.M.Y., 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem. Pharmacol.*, 63, 99-104.
- Das, D. K. and Maulik, N., 2006. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Mol. Interv.*, 6, 36-47.



Docherty, J.J., Smith, J.S., Fu, M.M., Stoner, T., Booth, T., 2004. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice. *Antiviral Res.*, 61, 19–26.

Fulda, S. and Debatin, K.M., 2006. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: A mini-review. *Cancer Detect. Prev.*, 30, 217–223.

García-Fuentes, M., Torres, D., Alonso, M., 2003. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloid Surf. B.*, 27, 159–168.

Hauss D J., 2007. Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 667-76.

Hu, F.Q., Jiang, S.P., Du, Y.Z., Yuan, H., Ye, Y.E., Zeng, S., 2006. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.*, 314, 83–89.

Jung, H.J., Seu, Y.B., Lee, D.G., 2007. Candidicidal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *C. albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 1324-1329.

Lv, K., Yu, A., Xi, Y., Li, H., Song, Z., Cui, J., Cao, F., Zhai, G., 2009. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *Int. J. Pharm.*, 372, 191–198.

Martín, A.R., Villegas, I., Sánchez-Hidalgo, M., Lastra, C.A., 2006. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br. J. Pharmacol.*, 147, 873–885.

Nazar, M.F, Khan, A.M., Shah, S.S., 2009. Microemulsion System with Improved Loading of Piroxicam: A Study of Microstructure. *AAPS PharmSciTech.*, 10, 1286-1294.

Pouton, C.W. and Porter, C.J., 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, 625-637.

Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi, C., Ricci, M., 2008. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. *Int. J. Pharm.*, 357, 295–304.

Rastija, V. and Medic-Saric, M., 2009. QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 400–408.

Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., Korting, H.C., 2007. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 59, 427–443.

Ulrich, S., Wolter, F., Stein, J.M., 2005. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 452 – 461.

Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H.J., 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control. Release*, 48, 223–236.

Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 1257–1272.

---

**CAPÍTULO 4: INVESTIGAÇÃO  
DO EFEITO DO TIPO DE NANOCARREADOR LIPÍDICO  
SOBRE A PENETRAÇÃO CUTÂNEA DO VERMELHO DE  
NILO USANDO MICROSCOPIA CONFOCAL DE  
VARREADURA A LASER**

---



*Os sistemas nanoestruturados lipídicos têm sido considerados uma estratégia bastante promissora para o aumento da penetração cutânea de fármacos. Entre estes sistemas destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), as nanoemulsões (NE) e as microemulsões (ME). Estes sistemas nanoestruturados são constituídos por lipídios altamente purificados e misturas complexas de glicerídeos apresentando tamanho de partícula variável. Devido ao aumento da superfície de contato do fármaco com os corneócitos, o efeito oclusivo provocado sobre a pele, a rápida e constante liberação do fármaco, e a ação do surfactante sobre a permeabilidade parecem estar envolvidos no aumento da permeação cutânea de fármacos a partir destes nanocarreadores (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002; SCHÄFER-KORTING, MEHNERT, KORTING, 2007).*

*A microscopia confocal de varredura laser (MCVL) é uma técnica bem estabelecida na investigação visual da pele, in vitro e in vivo, com diversas vantagens, como a facilidade na preparação da amostra, pois não requer a preparação necessária para a microscopia convencional ou histologia de rotina, é uma técnica não invasiva, possui alta resolução e visualização de imagens paralelas à superfície da amostra, e em várias profundidades sem a necessidade de cortes mecânicos (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004b; NEHAL, GAREAU, RAJADHYAKSHA, 2008). A MCVL tem sido amplamente utilizada para visualizar a distribuição através da pele e nos folículos pilosos, de corantes ou fármacos fluorescentes incorporados em variados sistemas nanoestruturados (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a e c; BORGIA et al., 2005; TEERANACHAIDEEKU et al., 2008; HWANG et al., 2009; RANCAN et al., 2009; WU, PRICE, GUY, 2009; ARAÚJO, THOMAZINE, LOPEZ, in press).*

*Neste trabalho, o vermelho de nilo, um fluorocromo lipofílico foi encapsulado nas NLS, NE e ME, e sua passagem através da pele foi avaliada usando células de difusão tipo Franz, e pele de orelha suína como modelo de membrana. Cortes histológicos da pele foram realizados em um criomicrotomo e analisados por MCVL. O efeito do tipo de nanocarreador lipídico sobre a penetração cutânea do VN foi então comparada.*

*Nos capítulos anteriores nós demonstramos que estes diferentes nanocarreadores lipídicos apresentam diferentes capacidades de incorporar o resveratrol e liberar o fármaco através da pele. Dentre*

*eles, as nanoemulsões conduziram a obtenção de maiores valores de fluxo e coeficiente de permeabilidade. Nesta etapa do trabalho, a MCVL foi empregada para visualizar a permeação de um corante lipofílico através dos diferentes nanocarreadores lipídicos.*

**Investigação do efeito do tipo de nanocarreador lipídico sobre a  
penetração cutânea do vermelho de Nilo usando microscopia  
confocal de varredura a laser**

Daiane Nemen e Elenara Lemos-Senna<sup>\*</sup>

*Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências  
Farmacêuticas,*

*Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, 88040-  
900, Florianópolis, SC, Brasil*





## INTRODUÇÃO

O tratamento tópico de doenças cutâneas apresenta inúmeras vantagens sobre a administração oral, incluindo menor atividade metabólica, liberação do fármaco diretamente no local a ser tratado, redução dos efeitos colaterais sistêmicos, possibilidade de obtenção de perfis de liberação contínuos e administração do medicamento de forma mais facilitada e mais conveniente para o paciente. No entanto, a pele é dotada de uma eficiente barreira exercida pela camada córnea que a protege frente aos agentes externos e, consequentemente, limita a penetração de substâncias através da mesma (BOUWSTRA et al., 2003; KOGAN & GARTI, 2006; SCHÄFER-KORTING, MEHNERT, KORTING, 2007).

Várias estratégias têm sido empregadas com o objetivo de aumentar a penetração cutânea de fármacos. Em especial, os avanços da nanotecnologia têm permitido o desenvolvimento de carreadores de fármacos com o intuito de melhorar a penetração cutânea ou mesmo de direcioná-los para locais específicos da pele (BORGIA et al., 2005). A melhora da penetração dérmica de princípios ativos contidos em carreadores lipídicos pode resultar do aumento da superfície de contato do fármaco com os corneócitos, do efeito oclusivo proporcionado após a sua aplicação na pele, da liberação rápida e constante, e dos efeitos promotores de absorção dos componentes da formulação, principalmente dos tensoativos. Ainda, os nanocarreadores podem se acumular nos folículos pilosos ou nos espaços entre os aglomerados ou sulcos dos corneócitos, onde podem ser misturar com os lipídios da pele, favorecendo a penetração (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a; CEVC & VIERL, 2010).

Entre os carreadores nanoestruturados com potencial aplicação tópica destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), as nanoemulsões (NE) e as microemulsões (ME). Estes sistemas nanoestruturados são constituídos por lipídios altamente purificados e misturas complexas de glicerídeos apresentando tamanho de partícula variável. Suas principais características incluem excelente estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis frente à degradação, capacidade de controle da liberação, excelente tolerabilidade, possibilidade de vetorização, além de não apresentar problemas relacionados à produção em grande escala e à esterilização (WANG, SUN, ZHANG, 2002; WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004;

MANJUNATH, REDDY, VENKATESWARLU, 2005). Enquanto as NLSs são sistemas matriciais organizados obtidos a partir de triglicerídeos sólidos, as NEs submicrométricas são obtidas como dispersões óleo em água, apresentando elevada estabilidade cinética, em decorrência do seu reduzido tamanho de gota. As MEs, por outro lado, são sistemas isotrópicos, transparentes, de baixa viscosidade e termodinamicamente estáveis, obtidas quando uma mistura de surfactantes apropriada é usada (VICENTINI et al., 2008; SHISHU, RAJAN, KAMALPREET, 2009). Apesar das várias evidências que apontam os nanocarreadores como promissores sistemas de liberação de fármacos para aplicação cutânea, estudos comparativos referentes à capacidade dos mesmos em aumentar a penetração de fármacos são escassos e algumas vezes contraditórios. Entretanto, a maioria dos autores concorda que a composição da formulação afeta grandemente a penetração cutânea.

Estudos anteriores demonstraram que nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões podem ser obtidas pelo método de difusão do solvente a quente, alterando apenas a composição da formulação. Estas nanopartículas foram preparadas usando triestearina ou óleo de rícino como componentes oleosos, e fosfatidilcolina de soja e ácido 12-hidroxiesteárico etoxilado (Solutol HS 15) como tensoativos lipofílico e hidrofílico, respectivamente. Estudos de permeação e retenção cutânea demonstraram que estes nanocarreadores lipídicos apresentavam diferentes capacidades de promover a penetração cutânea do resveratrol através da pele. Apesar do reduzido tamanho da gota e da elevada concentração do tensoativo Solutol HS 15, a aplicação da microemulsão levou à menor penetração cutânea do resveratrol.

A microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) é uma técnica bem estabelecida na visualização da pele, *in vitro* e *in vivo*, apresentando diversas vantagens, como a facilidade na preparação da amostra, pois não requer a preparação necessária para a microscopia convencional ou histologia de rotina, é uma técnica não invasiva, possui alta resolução e permite a visualização de imagens paralelas à superfície da amostra e em várias profundidades, sem a necessidade de cortes mecânicos (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004b; NEHAL, GAREAU, RAJADHYAKSHA, 2008; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008). A MCVL tem sido amplamente utilizada para visualizar a distribuição de corantes ou fármacos fluorescentes incorporados na pele e nos folículos pilosos, após a incorporação em sistemas de liberação

nanoestruturados (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a, 2004c; BORGIA et al., 2005; TEERANACHAIDEEKU et al., 2008; HWANG et al., 2009; RANCAN et al., 2009; WU, PRICE, GUY, 2009).

O vermelho de nilo (VN) é comumente usado como marcador fluorescente, visto que ele apresenta uma emissão de fluorescência intensa e estável após excitação com laser de HeNe a 543 nm. Ele também é utilizado como modelo para a aplicação tópica/transdérmica, por causa de sua alta lipofilicidade ( $\log P_{o/a} > 3$ ) e baixo peso molecular (318,4 g/mol) (WU, PRICE, GUY, 2009), sendo muito solúvel em solventes orgânicos e fortemente fluorescente em ambientes lipídicos hidrofóbicos (BORGIA et al., 2005).

Assim considerando o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de diferentes sistemas lipídicos nanoestruturados na penetração cutânea do vermelho de Nilo, usando a microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados obtidos neste estudo poderão ser empregados para confirmar o efeito do tipo de nanocarreador lipídico sobre a penetração cutânea de fármacos lipofílicos, contribuindo para a elucidação dos principais fatores envolvidos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Materiais**

O vermelho de Nilo (VN) foi adquirido da Sigma (St. Louis, USA). O óleo de rícino e a lecitina de soja hidrogenada (Lecitina S75-3N<sup>®</sup>) foram adquiridos da Via Pharma (São Paulo, Brasil) e SP Pharma (São Paulo, Brasil), respectivamente. A triestearina (Dynasan 118) foi gentilmente doada pela Sasol (Louisiana, EUA) e o hidroxiestearato de polietilenoglicol (Solutol HS-15<sup>®</sup>) foi doado pela Basf (Trostberg, Alemanha). Água ultra pura foi fornecida por sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA). Metanol grau HPLC foi adquirido da J.T Baker<sup>®</sup> (Phillipsburg, EUA). Etanol, acetona e outros reagentes químicos usados foram de grau analítico.

### **Preparação das dispersões coloidais de nanocarreadores lipídicos**

Os nanocarreadores lipídicos contendo vermelho de nilo foram preparados pelo método de difusão do solvente a quente (HU et al., 2006). Resumidamente, lecitina, triestearina (TS) ou óleo de rícino (OR) e vermelho de nilo foram dissolvidos em 5 mL de uma mistura de acetona:etanol (60:40, v/v) a 60°C. A solução orgânica resultante foi rapidamente adicionada em 50 mL de uma solução aquosa contendo Solutol HS 15<sup>®</sup>, mantido sobre agitação magnética a 82°C. A dispersão coloidal obtida foi então resfriada até temperatura ambiente, o solvente orgânico evaporado sobre pressão reduzida, e o volume final foi ajustado para 20 mL. Finalmente, a dispersão coloidal foi filtrada através de filtro de papel quantitativo de 8 µm (J.Prolab, Brasil). As nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões contendo vermelho de Nilo foram denominadas como NLS<sub>VN</sub>, NE<sub>VN</sub> e ME<sub>VN</sub>, respectivamente. A composição quali- e quantitativa das formulações é demonstrada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição das formulações de nanocarreadores lipídicos contendo vermelho de Nilo.

	Fase oleosa				Fase aquosa
	TS (mg)	OR (mg)	Lecitina(mg)	VN (mg)	Solutol HS15 (%)
NLS <sub>VN</sub>	100		20	1	0.1
NE <sub>VN</sub>	-	100	20	1	0.1
ME <sub>VN</sub>	-	100	10	1	1.0

### **Caracterização físico-química das dispersões coloidais nanocarreadoras lipídicas**

O tamanho médio e o potencial zeta das dispersões coloidais nanocarreadoras lipídicas contendo o vermelho de nilo foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As medidas foram realizadas a 25°C após diluição apropriada das amostras em água destilada. Cada análise de tamanho durou 120 s e foi obtida com um ângulo de detecção de 173 °. Para determinar o potencial zeta, as

amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados como a média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a equação de Smoluchowski.

### **Determinação do teor e eficiência de encapsulação do vermelho de Nilo**

Para a determinação da concentração de vermelho de Nilo nas dispersões, uma alíquota de cada dispersão coloidal foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume final foi completado com metanol. Após, as amostras foram centrifugadas e uma alíquota do sobrenadante foi diluída em metanol. As amostras foram analisadas em um espectrofotômetro de fluorescência LS 55 (PerkinElmer, Brasil). Os *slits* dos monocromadores de emissão e excitação foram ajustados a 5 nm. As amostras foram excitadas a 530 nm e as intensidades relativas de emissão foram obtidas em 635 nm. O método demonstrou ser linear no intervalo de concentração entre 0,005 e 0,4  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2 = 0,9988$ ,  $y = 793,26x + 1,3388$ ). Os valores de LD e LQ calculados foram 0,003  $\mu\text{g/mL}$  e 0,011  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, indicando a sensibilidade do método para a quantificação do vermelho de Nilo nos sistemas nanoestruturados lipídicos. A especificidade do método foi confirmada pela análise individual dos nanocarreadores lipídicos sem o marcador fluorescente. A eficiência de encapsulação (EE %) foi estimada como sendo a diferença entre a concentração total do VN e aquela encontrada no ultrafiltrado, obtido após ultrafiltração/centrifugação das dispersões coloidais utilizando unidades de filtração Ultrafree - MC (100.000 MWCO, Millipore, EUA). A concentração de vermelho de Nilo nas dispersões coloidais foi expressa em  $\mu\text{g}$  por mL.

### **Avaliação da penetração cutânea do VN por microscopia confocal de varredura a laser**

Os ensaios de penetração do VN foram realizados em células de difusão tipo Franz, empregando a pele de orelhas de porco como modelo de membrana. As orelhas de porco foram obtidas em um abatedouro na cidade de Antônio Carlos (Santa Catarina, Brasil). Imediatamente

após o abate dos porcos, as orelhas foram higienizadas, acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### **Preparo das células de difusão e experimento de permeação**

Antes da utilização, as amostras de pele foram descongeladas à temperatura ambiente. A parte posterior das orelhas foi destacada com auxílio de um bisturi, e os vasos sanguíneos e tecido adiposo remanescentes foram retirados com auxílio de uma pinça, a fim de obter amostras de pele de uma espessura homogênea (cerca de 1 mm). A pele foi então colocada em células de difusão tipo Franz, apresentando área nominal de difusão de  $2,35\text{ cm}^2$  e um volume de meio receptor de 10 mL, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada ao compartimento receptor. Anteriormente ao início do experimento, a pele foi hidratada com tampão fosfato isotônico ( $\text{pH} = 7,4$ ) por 12 horas, sob refrigeração (a cerca de  $4^{\circ}\text{C}$ ). Após, a solução tampão fosfato do compartimento receptor foi substituída por uma solução de metanol:tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,4$ ) (30:80, v/v), para assegurar as condições *sink*. O meio receptor das células de difusão foi mantido na temperatura de  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob agitação magnética. Uma alíquota de  $\text{SLN}_{\text{VN}}$ ,  $\text{NE}_{\text{VN}}$  e  $\text{ME}_{\text{VN}}$ , e de uma solução de metanol:tampão fosfato  $\text{pH}=7,4$  (30:70), contendo  $7\text{ }\mu\text{g}$  de vermelho de Nilo, assim como solução de metanol:tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,4$ ) (30:80, v/v) usada como controle, foram então aplicadas sobre a pele. Depois de transcorrido os tempos de 10 minutos, 30 minutos e 1 hora, os discos de pele foram removidos das células de difusão e secos cuidadosamente com papel filtro. O excesso do corante foi removido da superfície do estrato córneo com auxílio de fitas adesivas. Ao término do experimento de permeação, as amostras de pele foram congeladas em um meio de inclusão para criomicrotomo (EasyPath, Erviegas, SP, Brasil) e crioseções com uma espessura de  $20\text{ }\mu\text{m}$  foram realizados utilizando um criomicrotomo (Histostat Microtome, AO Scientific Instruments, EUA). Cada amostra foi cortada em 4 diferentes áreas, e em cada uma delas foram feitos 20 cortes, a fim de obter amostras representativas de cada tratamento.

## **Microscopia confocal de varredura laser**

As análises de microscopia confocal de varredura laser foram realizadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LEICA TCS-SPE, Mannheim, Alemanha), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME). O comprimento de onda de excitação, com o laser de He-Ne, foi em 543 nm, e o de emissão foi na faixa de 585 – 635 nm. As imagens foram obtidas com uma magnificação de 20×, a uma velocidade de 4  $\mu$ S/Pixel. Os cortes da pele foram visualizadas através de imagens microscópicas em luz de campo claro e fluorescente. Assim as imagens foram sobrepostas a fim de se obter a informação da distribuição do vermelho de nilo nas diferentes camadas da pele.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização físico-química das dispersões coloidais**

A capacidade dos sistemas nanoestruturados lipídicos em incorporar o vermelho de nilo foi avaliada e comparada, usando para isso os parâmetros de teor de fármaco e eficiência de encapsulação. O diâmetro médio das partículas das dispersões coloidais contendo vermelho de nilo variou em função do tipo de nanocarreador lipídico (Tabela 1), sendo cerca de 260, 119 e 27 nm, para as NLS<sub>VN</sub>, NE<sub>VN</sub> e ME<sub>VN</sub>, respectivamente. O índice de polidispersão, que é uma relação que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi baixo (< 0,3) para todas as dispersões obtidas, indicando a formação de sistemas monodispersos. As análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, decorrente da presença da lecitina, sendo observada uma redução nos valores de carga superficial nas microemulsões, provavelmente devido à presença de maiores concentrações de Solutol HS 15, um surfactante não ionizável, na interface das partículas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados lipídicos contendo vermelho de nilo (n = 3).

	<b>Tamanho de partícula (nm)</b>	<b>Índice de polidispersão</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
<b>NLS<sub>VN</sub></b>	260,2 ± 4,3	0,291 ± 0,03	- 31,6 ± 1,1
<b>NE<sub>VN</sub></b>	119,4 ± 6,2	0,117 ± 0,02	- 41,4 ± 0,4
<b>ME<sub>VN</sub></b>	27,5 ± 6,4	0,294 ± 0,04	-17,6 ± 2,7

### **Determinação do teor, e eficiência de encapsulação e recuperação do vermelho de nilo**

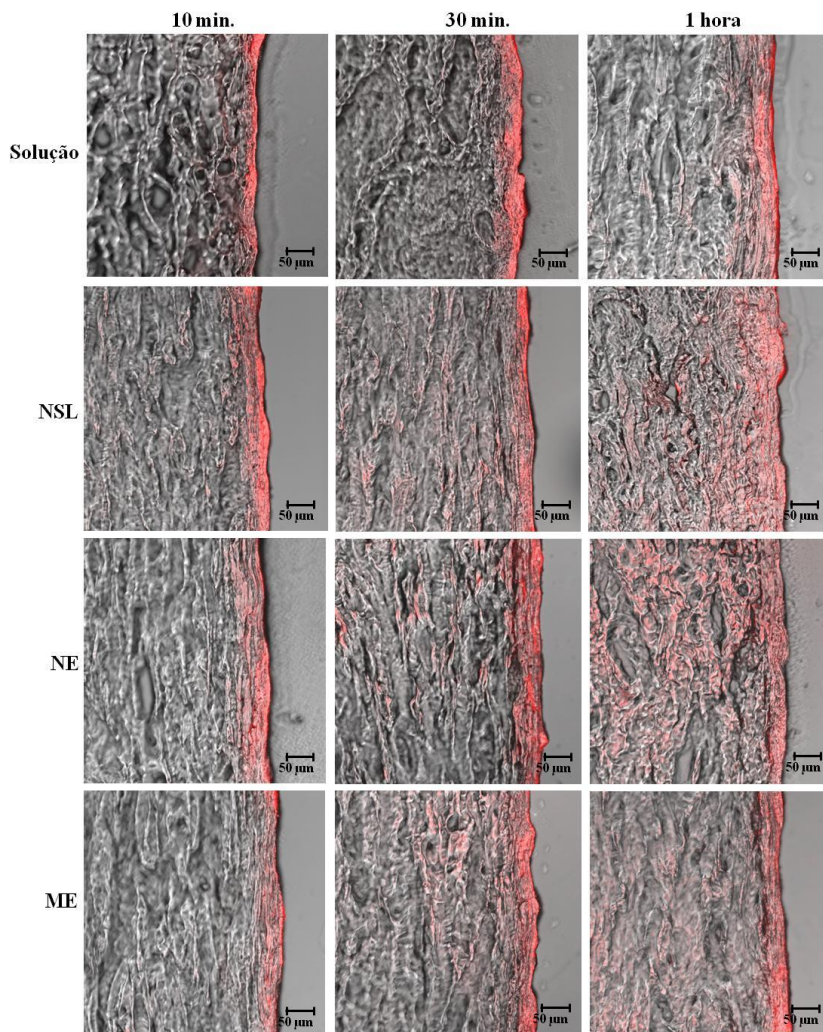
As análises do teor, eficiência de encapsulação e recuperação do vermelho de nilo foram estimados nas dispersões coloidais por fluorimetria. A eficiência de encapsulação foi quase 100% em todas as formulações testadas, demonstrando que praticamente todo corante encontra-se associado ao nanocarreador, devido à alta lipofilicidade do vermelho de nilo. Entretanto, os valores de teor de VN nas dispersões coloidais foram de 6,8, 18,6 e 19,6 µg/mL, respectivamente, para a NLS<sub>VN</sub>, NE<sub>VN</sub> e ME<sub>VN</sub>. Entre os três tipos de carreadores, as NLS demonstraram uma menor capacidade de incorporar o VN, de modo similar ao observado nos estudos de encapsulação do resveratrol nos mesmos sistemas. Estes resultados confirmam a menor capacidade das NLS em incorporar fármacos, seja devido à baixa solubilidade das substâncias na fase oleosa fundida, seja devido à formação de um cristal perfeito, após a solidificação das partículas, o qual é constituído de arranjos de lipídio altamente organizados, com poucas imperfeições que limitam o espaço para a acomodação das moléculas ou cristais de fármaco (WESTESEN, BUNJES, KOCH, 1997; GARCÍA-FUENTES, TORRES, ALONSO, 2003; WISSING, KAYSER, MÜLLER, 2004).



## **Avaliação da penetração cutânea do vermelho de Nilo por microscopia confocal de varredura laser**

A MCVL é uma técnica bem estabelecida para se observar a distribuição de fármacos dentro da pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004b; LADEMANN et al., 2007). O vermelho de Nilo tem sido usado para estudar a penetração cutânea a partir de diferentes tipos de sistemas nanoestruturados, como nanopartículas poliméricas (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a; WU et al., 2009; WU, PRICE, GUY, 2009), nanopartículas lipídicas sólidas (BORGIA et al., 2005; KÜCHLER et al., 2009) e carreadores lipídicos nanoestruturados (BORGIA et al., 2005; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008). Neste estudo, a MCVL foi empregada para avaliar a permeação *in vitro* do vermelho de Nilo encapsulado nas NLS, NE, ME. Uma solução contendo o VN, a uma mesma concentração, foi igualmente testada com o objetivo de verificar o efeito da nanoencapsulação sobre a permeação cutânea. As imagens foram obtidas por sobreposição da microscopia de campo claro e fluorescência da mesma área de análise. Nas condições utilizadas, a autofluorescência da pele não foi observada. Igualmente, a aplicação dos nanocarreadores brancos (sem o vermelho de nilo) não conduziu ao aparecimento de fluorescência.

A Figura 1 mostra fotomicrografias representativas dos cortes verticais da pele suína após 10 minutos, 30 minutos e 1 hora de ensaio de permeação. A intensidade de fluorescência pode ser observada no estrato córneo, epiderme viável e derme de uma forma qualitativa. Como pode ser verificada na Figura 1, a penetração do VN foi maior quando os sistemas nanoestruturados lipídicos foram aplicados na pele, em comparação à solução do corante. Neste caso, com a aplicação da solução de VN, a fluorescência foi detectada predominantemente no estrato córneo, mesmo após 1 hora do ensaio de permeação, indicando a localização preferencial do corante nesta camada da pele. Esse resultado foi similar ao observado por Alvarez-Román e colaboradores (2004a), em que a penetração do corante não foi observada após a aplicação de uma solução saturada de VN em propilenoglicol sobre a pele.



**FIGURA 1.** Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de varredura a laser obtidas após estudos de permeação do vermelho de Nilo a partir das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (NE), e microemulsões (ME) e da solução de VN.

Por outro lado, a encapsulação do VN nos sistemas lipídicos nanoestruturados, conduziu a maior penetração do corante em camadas profundas da pele, alcançando à derme, mesmo após 30 minutos da aplicação. A intensidade de fluorescência pareceu ser maior a partir das NLS e NE, quando comparado com a visualizada após aplicação das MEs contendo VN. Estes resultados corroboram com os achados nos estudos de penetração cutânea do resveratrol em que as microemulsões demonstraram ser menos efetivas em promover a penetração do fármaco através da pele. Considerando que tais sistemas apresentam menor tamanho de partícula e maior concentração de tensoativo, pode dizer que estas características não foram preponderantes para a melhoria da penetração. Uma possível explicação para este resultado é que o revestimento hidrofílico proporcionado pela presença das cadeias de polietilenoglicol na superfície das gotículas da microemulsão tenha conduzido à menor interação com os lipídeos do estrato córneo, dificultando a difusão do corante. Entretanto, estudos de interação dos sistemas lipídicos estudados com a pele são necessários para confirmar esta hipótese.

## CONCLUSÃO

A utilização da MCVL se mostrou uma técnica útil para a avaliação da capacidade dos nanocarreadores lipídicos em liberar o VN através da pele. O efeito promotor da penetração cutânea dos nanocarreadores lipídicos foi evidenciada neste trabalho. Entretanto, dentre os sistemas testados, as MEs demonstraram ser menos efetivas no que se refere ao aumento da penetração cutânea do vermelho de Nilo, possivelmente devido ao caráter hidrofílico da superfície das gotículas.

**REFERÊNCIAS**

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm Res*, v. 21, p. 1818–1825, 2004a.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A. KALIA, Y.N.; FESSI, H.; GUY, R.H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 58, p. 301–316, 2004b.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*, v. 99, p. 53–62, 2004c.

BORGIA, S.L.; REGEHLY, M.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MEHNERT, W.; KORTING, H.C.; DANKER, K.; RÖDER, B.; KRAMER, K.D.; SCHÄFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. *J Control Release*, v. 110, p. 151–163, 2005.

BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progr Lipid Res*, v.42, p.1-36, 2003.

CEVC, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *J Control Release*, v. 141, p. 227-299, 2010.

GARCÍA-FUENTES, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloid Surf B*, v. 27, p. 159–168, 2003.

HU, F.Q., JIANG, S.P., DU, Y.Z., YUAN, H., YE, Y.E., ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm*, v. 314, p. 83–89, 2006.

HWANG, T.L.; FANG, C.L.; CHEN, C.H.; FANG, J.Y. Permeation Enhancer-Containing Water-In-Oil Nanoemulsions as Carriers for Intravesical Cisplatin Delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 26, p. 2314-2323, 2009.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 123–126, p. 369–385, 2006.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E.J.; JAROSZEWSKI, J.W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Control Release*, v. 69, p. 421–433, 2000.

KÜCHLER, S.; RADOWSKI, M.R.; BLASCHKE, T.; DATHE, M.; PLENDL, J.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTING, M.; KRAMER, K.D. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 71, p. 243–250, 2009.

LADEMANN, J.; OTBERG, N.; RICHTER, H.; MEYER, L.; AUDRING, H.; TEICHMANN, A.; THOMAS, S.; KNÜTTTEL, A.; STERRY, W. Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Res Technol*, v. 13, p. 119–132, 2007.

MANJUNATH, K., REDDY, J.S., VENKATESWARLU, V. Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol*, v. 27, p. 127–144, 2005.

NEHAL, K.S.; GAREAU, D.; RAJADHYAKSHA, M. Skin Imaging With Reflectance Confocal Microscopy. *Semin Cutan Med Surg*, v. 27, p. 37–43, 2008.

RANCAN, F., PAPAKOSTAS, D., HADAM, S., HACKBARTH, S., DELAIR, T., PRIMARD, C., VERRIER, B., STERRY, W., BLUME-PEYTAVI, U., VOGT, A. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm Res*, v. 26, p. 2027–2036, 2009.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Delv Rev*, v. 59, p. 427–443, 2007.

SHISHU, RAJAN, S., KAMALPREET. Development of Novel Microemulsion-Based Topical Formulations of Acyclovir for the Treatment of Cutaneous Herpetic Infections. *AAPS PharmSciTech*, v. 10 (2), p. 559–565, 2009.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; BOONME, P.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *J Control Release*, v. 128, p. 134–141, 2008.

TEICHMANN, A.; HEUSCHKEL, S.; JACOBI, U.; PRESSE, G.; NEUBERT, R.H.H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 67, p. 699–706, 2007.

VICENTINI, F.T.M.C., SIMI, T.R.M., DEL CIAMPO, J.O., WOLGA, N.O., PITOL, D.L., IYOMASA, M.M., BENTLEY, M.V.L.B., FONSECA, M.J.V. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 69, p. 948–957, 2008.

WANG, J. X., SUN, X., ZHANG, Z. R. Enhanced brain targeting by synthesis of 3', 5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 54, p. 285–290, 2002.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M.H.J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Control Release*, v. 48, p. 223–236, 1997.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 56, p. 1257–1272, 2004.

WU, X.; BIATRY, B.; CAZENEUVE, C.; GUY, R.H. Drug Delivery to the Skin From Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity. *Pharm Res*, v. 26, p. 1995–2001, 2009.

WU, X.; PRICE, G.J.; GUY, R.H. Disposition of Nanoparticles and an Associated Lipophilic Permeant following Topical Application to the Skin. *Mol Pharm*, v. 6, p. 1441–1448, 2009.

---

## **DISCUSSÃO GERAL**

---





O resveratrol (3,4,5-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina presente numa grande variedade de espécies vegetais que tem mostrado inúmeros benefícios à saúde. Este composto apresenta diversas atividades farmacológicas, tais como antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antioxidante, cardioprotetora e anti-inflamatória, entre outras (GOSWAMI & DAS, 2009). Entretanto, esta substância, além de ser pouco solúvel em água, sofre extenso metabolismo pré-sistêmico, fazendo com que a concentração sanguínea da forma inalterada não seja detectada após administração oral. Por outro lado, inúmeros estudos relatam os benefícios do resveratrol sobre a pele, fazendo com que a liberação tópica deste composto constitua uma interessante alternativa à administração oral para o tratamento de várias desordens cutâneas. O resveratrol tem demonstrado fortes propriedades antiproliferativas e quimiopreventivas contra a carcinogênese (JANGA & PEZZUTO, 1998; SOLEAS et al., 2002; AZIZ et al., 2005), proteção contra os danos causados pela radiação ultravioleta, e atividade antimicrobiana contra dermatófitos e ao vírus Herpes simplex (CHAN, 2002; AFAQ, ADHAMI & AHMAD, 2003; DOCHERTY et al., 2004; AZIZ, AFAQ & AHMAD, 2005). Entretanto, poucos estudos são citados na literatura com vistas a aplicação tópica desta substância.

A administração cutânea de fármacos tem sido considerada uma via não-invasiva que exhibe inúmeras vantagens sobre as outras vias de administração. O emprego desta via evita o metabolismo de primeira passagem, possibilita o prolongamento da ação, permite a redução dos efeitos colaterais indesejáveis decorrentes da absorção sistêmica, e é mais aceitável para o paciente, principalmente quando o tratamento de desordens cutâneas é desejado. Entretanto, a administração cutânea ainda é um desafio na área farmacêutica, visto que o estrato córneo impõe uma barreira à passagem de fármacos, dificultando o alcance do mesmo nas diferentes camadas da pele. Diferentes estratégias têm sido testadas com o objetivo de romper a barreira imposta pela camada córnea e aumentar a passagem de fármacos através da pele, incluindo o emprego de sistemas nanoestruturados lipídicos (RIZWAN et al., 2009). Assim, buscando obter formulações destinadas à administração tópica cutânea, a encapsulação do resveratrol em sistemas nanoestruturados lipídicos foi realizada, usando o método de difusão do solvente a quente para a preparação das dispersões coloidais. Neste trabalho foi empregado a triestearina e o óleo de rícino como lipídio sólido e líquido na fase oleosa da preparação, e a lecitina de soja e o Solutol HS 15, como tensoativos lipofílico e hidrofílico, respectivamente. Estudos

anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que em função da composição das formulações, ou seja, tipo de lipídio e concentração de Solutol HS 15 na fase aquosa, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões (NE) e microemulsões (ME) podem ser obtidas. Neste caso, NLS e NE foram obtidas usando Solutol HS 15 0,1%. As ME foram obtidas com o uso de Solutol HS 15 1% (DORA et al., 2009).

As dispersões coloidais, preparadas na ausência e na presença de diferentes quantidades iniciais de resveratrol, foram caracterizadas quanto ao seu tamanho e potencial zeta. O diâmetro médio das partículas das dispersões coloidais brancas variou em função do tipo de nanocarreador lipídico, sendo cerca de 221, 119 e 22 nm, para as NLS<sub>b</sub>, NE<sub>b</sub> e ME<sub>b</sub>, respectivamente. A adição do resveratrol às formulações não afetou o diâmetro médio das partículas, e todos os sistemas foram monodispersos. As análises de potencial zeta indicaram a obtenção de partículas de carga negativa, decorrente da presença da lecitina, sendo observado uma redução nos valores de carga superficial nas microemulsões, provavelmente devido à presença de maiores concentrações de Solutol HS 15, um surfactante não ionizável, na interface das partículas.

A capacidade dos sistemas nanoestruturados lipídicos em incorporar o resveratrol foi avaliada e comparada, usando para isso os parâmetros de teor de fármaco e eficiência de encapsulação. Para tal, um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido e validado. O conjunto dos resultados de validação indicou que o método de cromatografia em fase reversa desenvolvido para a determinação do resveratrol nos sistemas nanoestruturados lipídicos foi específico, linear, preciso e exato. A eficiência de encapsulação foi maior de 94% para todas as formulações testadas, demonstrando que a maior parte do fármaco encontra-se associado ao nanocarreador. Entretanto, os valores de teor de fármaco variaram de 186,9 a 852,8 µg/mL, dependendo da formulação. Entre os três tipos de carreadores, as NLS demonstraram uma menor capacidade de incorporar o resveratrol. De fato, as NLS têm demonstrado uma limitada capacidade de incorporar fármacos, seja devido à baixa solubilidade das substâncias na fase oleosa fundida, seja devido à formação de um cristal perfeito, após a solidificação das partículas, constituído de arranjos de lipídio altamente organizados, com poucas imperfeições que limitam o espaço para a acomodação das moléculas ou cristais de fármaco (WESTESEN & BUNJES, KOCH, 1997; WISSING, KAYSER,

MÜLLER, 2004; GARCIA-FUENTES, ALONSO, TORRES, 2005). Por outro lado, para as microemulsões, os valores de recuperação elevados evidenciaram a elevada capacidade de tais sistemas em solubilizar fármacos hidrofóbicos, devido à alta capacidade de solubilização (NAZAR, KHAN, SHAH, 2009). As microemulsões permitiram o aumento da solubilidade deste fármaco em até 28,4 vezes, podendo esta concentração ainda ser maior, visto que a adição de quantidades iniciais maiores de resveratrol não foram testadas.

Visando obter uma preparação com uma viscosidade mais elevada, a HEC foi adicionada às dispersões coloidais. A adição de HEC, na concentração usada, conduziu à obtenção de sistemas pseudoplásticos, sendo que a presença dos nanocarreadores provocou um aumento na viscosidade, quando comparado à viscosidade do gel de HEC puro obtidos na mesma concentração. O teor de fármaco encontrado nos nanogéis foi similar aos encontrados nas dispersões coloidais. As fotomicrografias realizadas por SEM-FEG, mostra diferenças na morfologia das partículas, evidenciando a diferença na estrutura dos carreadores lipídicos.

Os sistemas nanocarreadores contendo resveratrol em dispersão e em gel foram analisados quanto a sua permeação em células de difusão tipo Franz, utilizando pele de orelha suína, como modelo de membrana por um período de 8 horas. O fluxo de permeação (J), o tempo de latência e o coeficiente de permeabilidade foram estimados após a construção do gráfico da quantidade permeada ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) *versus* tempo (h). A permeação e a retenção do RV foram significativamente afetadas pelo tipo de nanocarreador lipídico. O fluxo e o coeficiente de permeabilidade diminuíram na seguinte ordem:  $\text{ME}_{\text{RV}} < \text{NLS}_{\text{RV}} < \text{NE}_{\text{RV}}$  ( $P < 0,05$ ). Tendo em vista que as MEs apresentaram uma grande capacidade de solubilização do RV, formulações foram preparadas com diferentes quantidades de fármaco e avaliadas nos estudos de permeação. Neste estudo foi verificado o aumento do fluxo do RV através da pele após a aplicação da ME apresentando a maior concentração de fármaco ( $P < 0,001$ ). Entretanto, mesmo tendo uma maior concentração de RV, as MEs levaram à obtenção de valores de fluxo menor que aqueles observados após aplicação da NEs. O tempo de latência não variou para a maioria das formulações, e a quantidade de fármaco retido na pele demonstrou ser significativamente reduzida, somente quando as NLS foram aplicadas ( $P < 0,01$ ). Estes resultados

indicaram que dentre os sistemas estudados, a ME exibiu menor capacidade de promover a penetração do resveratrol através da pele.

No intuito de confirmar os resultados obtidos anteriormente e visualizar as diferenças produzidas pelos diferentes nanocarreadores sobre a permeação de um fármaco lipofílico, o vermelho de Nilo foi incorporado nas NLSs, NEs e MEs. O tamanho e o potencial zeta destes sistemas foram similares aos contendo resveratrol. A eficiência de encapsulação foi quase 100% em todas as formulações testadas, demonstrando que praticamente todo corante encontra-se associado ao nanocarreador, devido a sua alta lipofilicidade. Entretanto, os valores de teor de fármaco foram de 6,8, 18,6 e 19,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para a NLS<sub>VN</sub>, NE<sub>VN</sub> e ME<sub>VN</sub>. Estudos de permeação foram então conduzidos em células de Franz, usando a pele de orelha de porco como modelo de membrana. Após 10 min, 30 min e 1 hora de ensaio de permeação, as amostras de pele foram removidas das células de difusão, e observadas por microscopia confocal de varredura laser. O emprego desta técnica evidenciou a maior permeação do VN nas camadas profundas da pele quando as dispersões coloidais foram testadas, quando comparado com solução de VN utilizada como controle. Além disso, a menor penetração do corante a partir das MEs pode ser visualizada, confirmando os resultados obtidos nos estudos de permeação realizados com o resveratrol. Considerando que tais sistemas apresentam menor tamanho de partícula e maior concentração de surfactante, pode-se dizer que estas características não foram preponderantes para a melhoria da penetração. Uma possível explicação para este resultado é que o revestimento hidrofílico proporcionado pela presença das cadeias de polietilenoglicol na superfície das gotículas da microemulsão tenha conduzido à menor interação com os lipídeos do estrato córneo, dificultando a difusão do corante. Entretanto, estudos de interação dos sistemas lipídicos estudados com a pele são necessários para confirmar esta hipótese.

---

**CONCLUSÕES**

---



- A preparação das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e microemulsões contendo resveratrol, pelo método de difusão do solvente a quente, demonstrou-se viável e de simples execução.
- Um método por CLAE foi desenvolvido visando a determinação do resveratrol nas formulações. O método mostrou ser específico, linear, exato, preciso e sensível para quantificação do RV. O método foi empregado nos estudos de permeação do resveratrol através da pele. Neste caso, não foi observada interferência dos componentes da pele sobre a determinação do RV.
- Todos os sistemas estudados apresentaram potencial zeta com carga negativa e monodispersos, com o tamanho variando em função do tipo de nanocarreador lipídico, sendo cerca de 215, 115 e 20 nm, para as NLS, NE e ME, respectivamente.
- A eficiência de encapsulação do resveratrol nos sistemas lipídicos nanoestruturados foi maior que 94 %. Entretanto, os valores de teor de RV ( $\mu\text{g/mL}$ ) e recuperação (%) variaram de acordo com o tipo de nanocarreador e a quantidade de fármaco adicionada. Uma maior capacidade de incorporação do fármaco foi verificada para a na microemulsão, alcançando um aumento na concentração do RV em cerca de 28 vezes em relação a sua solubilidade aquosa.
- A incorporação de HEC nas dispersões coloidais conduziu à obtenção de nanogéis apresentando comportamento pseudoplástico. Um aumento na viscosidade dos géis contendo RV foi verificado na presença dos nanocarreadores lipídicos, sendo que o aumento mais pronunciado ocorreu com os géis contendo NLS, provavelmente devido à presença de partículas sólidas na preparação.

- A visualização dos filmes obtidos a partir dos nanogéis demonstrou diferenças na morfologia das partículas. Enquanto as nanoemulsões e microemulsões exibiram estruturas de formato esférico, as nanopartículas sólidas exibiram faces quadradas, característicos de sistemas cúbicos.
- Estudos de penetração *in vitro* evidenciaram que o tipo de nanocarreador lipídico afeta significativamente a velocidade de permeação e o coeficiente de permeabilidade, os quais diminuíram na seguinte ordem:  $ME_{RV} < NLS_{RV} < NE_{RV}$ . Entretanto, o tempo de latência não variou entre estes sistemas estudados.
- A permeação do RV a partir da ME demonstrou ser afetada pela concentração de fármaco encapsulado. Entretanto todos os valores de fluxo obtidos foram mais baixos que aquele observado para a NE.
- A aplicação das formulações, na forma de dispersão coloidal ou de nanogel, não alterou os parâmetros analisados, com exceção da NE, que apresentou menores valores de fluxo e coeficiente de permeabilidade, com um aumento no tempo de latência, em relação a sua forma em gel.
- A quantidade de fármaco retida na pele não demonstrou diferenças significativas entre os diferentes sistemas lipídicos aplicados na mesma concentração. Entretanto, o aumento da quantidade retida foi verificada com o aumento da quantidade de RV encapsulado na microemulsão.
- As características físico-químicas dos nanocarreadores lipídicos, contendo com o corante vermelho de Nilo, foram



similares as encontradas com os sistemas contendo resveratrol. As  $NLS_{VN}$ ,  $NE_{VN}$  e as  $ME_{VN}$  apresentaram teores de 6,8, 18,6 e 19,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A eficiência de encapsulação do vermelho de Nilo nestes sistemas foi elevada (acima de 99 %), demonstrando a grande afinidade deste corante hidrofóbico pelas nanoestruturas.

- As fotomicrografias obtidas por análises de MCVL, das formulações contendo vermelho de Nilo, evidenciaram a menor penetração do corante após aplicação das MEs, corroborando com resultados obtidos com os ensaios de permeação realizados com o resveratrol. Além disso, observou-se uma acentuada penetração nas camadas profundas da pele quando os sistemas nanoestruturados lipídicos foram aplicados, em comparação com a aplicação de uma solução contendo o mesmo corante, numa mesma concentração.



---

## REFERÊNCIAS

---



AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; AHMAD, N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 186, p. 28–37, 2003.

AKOMEAH, F.; NAZIR, T.; MARTIN, G.P.; BROWN, M.B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.21, p. 337-45, 2004.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A. KALIA, Y.N.; FESSI, H.; GUY, R.H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 58, p. 301–316, 2004.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int J Pharm*, v. 341, p. 215–220, 2007.

ANEKONDA, T.S. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*, v. 52, p. 316 – 326, 2006.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. *Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2007, p. 323-326.

ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BAÑO, M. C.; OBRADOR, E. & ESTRELA, J. M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radic. Biol.Med.*, v. 33, p. 387–398, 2002.

ATHAR, M.; BACK, J.B.; TANG, X.; KIM, K.H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D.R.; KIM, A.L. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 224, p. 274–283, 2007.

AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2005, p. 504-531.

AZEEM, A.; AHMAD, F.J.; KHAR, R.K.; TALEGAONKAR, S. Nanocarrier for the transdermal delivery of an antiparkinsonian drug. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 1093-1103, 2009.

AZIZ, M.H.; AFAQ, F.; AHMAD, N. Prevention of Ultraviolet-B Radiation Damage by Resveratrol in Mouse Skin Is Mediated via Modulation in Survivin. *Photochem. Photobiol.*, v. 81, p. 25–31, 2005.

AZIZ, M.H.; REAGAN-SHAW, S.; WU, J.; LONGLEY, B.J.; AHMAD, N. Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *The FASEB Journal*, 2005.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 60, p. 21–37, 2003.

BARRY, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. S31–S40, 2002.

BARRY, B.W. Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 14, p. 101–114, 2001.

BAUR, J. A. & SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, p. 493–506, 2006.

BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V.V.; ALLARD, J.S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K.; PISTELL, P.J.; POOSALA, S.; BECKER, K.G.; BOSS, O.; GWINN, D.; WANG, M.; RAMASWAMY, S.; FISHBEIN, K.W.; SPENCER, R.G.; LAKATTA, E.G.; LE COUTEUR, D.; SHAW, R.J.; NAVAS, P.; PUIGSERVER, P.; INGRAM, D.K.; CABO, R.; SINCLAIR, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, v. 444, p. 337–342, 2006.

BENITA, S. Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998. p. 340.

BÉDUNEAU, A.; SAULNIER, P. BENOIT, J.P. Active targeting of tumors using nanocarriers. *Biomaterials*, v. 28, p. 4947–4967, 2007.

BHALEKAR, M.R.; POKHARKAR, V.P.; MADGULKAR, A.; PATIL, N.; PATIL, P. Preparation and Evaluation of Miconazole Nitrate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 289–296, 2009.

BOOCCOCK, D.J., GESHER, A.J., BROWN, V., FAUST, G.E., PATEL, K.R., MURRAY, S.I., NORMOLLE, D.P., BOOTH, T.D., CROWELL,

J.A., DUCHARME, M.P., SCHINAS, A.M., STEWARD, W.P., BRENNER, D.E. Phase I single-dose safety and pharmacokinetics clinical study of the potential cancer chemopreventive agent resveratrol. In: AACR MEETING, 97<sup>o</sup>, Washington. *Proc Amer Assoc Cancer Res*. Philadelphia: American Association Research, 2006. v. 47. Disponível em: <http://aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/abstract/2006/1/1351>.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Int J Pharm*, v.280, p. 241-251, 2004.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. S41-S55, 2002.

BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; GOORIS, G.S.; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progr. Lipid. Res.*, v.42, p.1-36, 2003.

BOVE, K., LINCOLN, D.W., TSAN, M.F. Effect of resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 291, p. 1001-1005, 2002.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds. *J Pharm Sci*, v. 73, p. 1255-1263, 1984 *Apud* SARVEIYA,V.; RISK,S.; BENSON, H.A.E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. *J Chrom B*, v. 803, p.225-231, 2004.

BOUNOURE, F.; SKIBA, M.L.; BESNARD, M.; ARNAUD, P.; MALLET, E.; SKIBA, M. Effect of iontophoresis and penetration enhancers on transdermal absorption of metopimazine. *J Dermatol Sci*, v. 52, p. 170-177, 2008.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 3337-3340, 2002.

CEVC, G.; VIERL, U. Spatial distribution of cutaneous microvasculature and local drug clearance after drug application on the skin. *J Control Release*, v. 118, p. 18-26, 2007.

CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; MISHRA, B.; SINGH, S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 73, p. 1–15, 2009.

CHAN, M. M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol*, v. 63, p.99-104, 2002.

CHAN, M.M.Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem. Pharmacol.*, v. 63, p. 99-104, 2002.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A.C.; RODRIGUES, C.A.; SALGADO, H.R.N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. *Rev. Bras. Farm.*, v. 88, p. 7-13, 2007.

CONSTANTINIDES, P.P.; CHAUBAL, M.V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 60, p. 757–767, 2008.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Ther Drug Carrier Syst*, v. 19, p. 99-134, 2002.

CROWELL, J.A., KORYTKO, P.J., MORRISSEY, R.L., BOOTH, T.D., LEVINE, B.S. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol. Sci.*, v. 82, p. 614–619, 2004.

DAS, D. K. & MAULIK, N. Resveratrol in Cardioprotection: A Therapeutic Promise of Alternative Medicine. *Mol. Interv.*, v. 6, p. 36-47, 2006.

DOCHERTY, J.; FU, M.M.H.; STIFFLER, B.S.; LIMPEROS, R.J.; POKABLA, C.M.; DELUCIA, A.L. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res*, v. 43, p. 135–145, 1999.



DOCHERTY, J.J.; SMITH, J.S.; FU, M.M.; STONER, T.; BOOTH, T. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice . *Antiviral Res.*, v. 61, p. 19–26, 2004.

DORA, C.L.; SILVA, L.F.C.; SOLDI, V.; PIGNOT-PAINTRAND, I.; BORSALI, R.; LEMOS-SENNA, E.; Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Copenhagen, Dinamarca, 2009.

EL MAGHRABY, G.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, v.34, p. 203-222, 2008.

ELSHAFEEY, A.H.; KAMEL, A.O.; FATHALLAH, M.M. Utility of Nanosized Microemulsion for Transdermal Delivery of Tolterodine Tartrate: Ex-Vivo Permeation and In-Vivo Pharmacokinetic Studies. *Pharm. Res.*, v. 26, p. 2446-2453, 2009.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2986–3008, 2008.

FANG, J.Y.; HUNG, C.F.; LIAO, M.H.; CHIEN, C.C. A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 67, p. 67–75, 2007.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 17, p. 2950–2962, 2009.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. *J Pharm Biomed Anal*, v. 24, p. 155-165, 2000.

FLORENCE A.T.; ATTWOOD D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, p. 534.

FONSECA, C.; SIMÕES, S.; GASPAR, R. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release*, v. 83, p. 273-286, 2002.

FRANTZ, S.W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. *In: KEMPPAINEN, B.W.; REIFENRATH, W.E. (eds.). Methods for Skin Absorption.* Boca Raton: CRC, 1990, p. 35-59.

FREITAS, C.; MÜLLER, R.H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN(TM)) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm.*, v. 47, p. 125–32, 1999.

FRÉMONT, L. Biological Effects of Resveratrol. *Life Sci.*, v. 66, p. 663-673, 2000.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C. MARQUES, M.P.M. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. *Medicinal Res Rev*, p. 1-20, 2006.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr*, v. 61, p. 549-54, 1995.

FULDA, S. & DEBATIN, K. M. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: A mini-review. *Cancer Detect. Prev.*, v. 30, p. 217–223, 2006.

GARCÍA-FUENTES, M.; TORRES, D.; ALONSO, M. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloid Surf. B.*, v. 27, p. 159–168, 2003.

GAUTAM, S.C.; XU, Y.X.; DUMAGUIN, M.; JANAKIRAMAN, N.; CHAPMAN, R.A. Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. *Bone Marrow Transplantat.*, v. 25, p. 639–645, 2000.

GEVE, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 56, p. 675– 711, 2004.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 59, p. 1152–1161, 2007.

- GOLDBERG, D.M.; YAN, J.; SOLEAS, G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.*, v. 36, p. 79–87, 2003.
- GOSWAMI, S.K.; DAS, D.K. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett.*, v. 284, p. 1–6, 2009.
- GRAF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MÜLLER, R.H., VERBAVATZ, J.M., LANGER, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv Drug Deliv Rev*, v.16, p. 215-233, 1995.
- GUPTE, A.; CIFTCI, K. Formulation and characterization of paclitaxel, 5-FU and paclitaxel + 5-FU microspheres. *Int J Pharm*, v. 276, p. 93-106, 2004.
- GUSMAN, J.; MALONNE, H. & ATASSI, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, v. 22 (8), p. 1111-1117, 2001.
- HADGRAFT J. Skin, the final frontier. *Int.J.Pharm.*, v. 224, p. 1-18, 2001.
- HADGRAFT, J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 58, p. 291–299, 2004.
- HAO, H. D. & HE, L. R. Mechanisms of Cardiovascular Protection by Resveratrol. *J Med Food*, v.7, p. 290-298, 2004.
- HAQ, M.I.; SMITH, E., JOHN, D.N.; KALAVALA, M.; EDWARDS, C.; ANSTEY, A.; MORRISSEY, A.; BIRCHALL, J.C. Clinical administration of microneedles: skin puncture, pain and sensation. *Biomed Microdevices*, v. 11, p. 35–47, 2009.
- HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol. Ther.*, v.17, p. 6-15, 2004.
- HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. W.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 2179–2205, 2007.

HAUSS, D.J. Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 59, p. 667-676, 2007.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.*, v. 19, p. 875-880, 2002.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; VENIER-JULIENNE, M.; PROUST, J.; PHAN-TAN-LUU, R.; BENOIT, J. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *Eur J Pharm Sci*, v. 18, p. 55-61, 2003.

HOLME, A.L.; PERVAIZ, S. Resveratrol in cell fate decisions. *J. Bioenerg. Biomembr.*, v. 39, p. 59-63, 2007.

HORN, T.L., CWIK, M.J., MORRISSEY, R.L., KAPETANOVIC, I., CROWELL, J.A., BOOTH, T.D., MCCORMICK, D.L. Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53<sup>(±)</sup> (p53 knockout) mice. *Food Chem. Toxicol.*, v. 45, p. 55-63, 2007.

HOWITZ, K.T.; BITTERMAN, K.J.; COHEN, H.Y.; LAMMING, D.W.; LAVU, S.; WOOD, J.G.; ZIPKIN, R.E.; CHUNG, P.; KISIELEWSKI, A.; ZHANG, L.; SCHERER, B.; SINCLAIR, D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, v. 425, p. 191-196, 2003.

HU, F.Q.; JIANG, S.P.; DU, Y.Z.; YUAN, H.; YE, Y.Q.; ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm*, v. 314, p. 83-89, 2006.

HU, F.Q.; YUAN, H.; ZHANG, H.H.; FANG, M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm*, v. 239, p. 121-128, 2002.

HU, Y.; SUN, C.Y.; HUANG, J.; HONG, L.; ZHANG, L.; CHU, Z.B. Antimyeloma effects of resveratrol through inhibition of angiogenesis. *Chin Med J*, v.120, p. 1672-1677, 2007.

HUNG, C.F.; LIN, Y.K.; HUANG, Z.R.; FANG, J.Y. Delivery of Resveratrol, a Red Wine Polyphenol, from Solutions and Hydrogels via the Skin. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 31(5), p. 955—962, 2008.

IGNATOWICZ, E. & BAER-DUBOWSKA, W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *Polish J Pharm*, v. 53, p. 557-569, 2001.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMAN, J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Res. Technol.*, v. 13, p. 19–24, 2007.

JANG, M.; PEZZUTO, J.M. Effects of resveratrol on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Lett.*, v. 134, p. 81-89, 1998.

JUAN, M.E.; VINARDELL, M.P.; PLANAS, J.M. The Daily Oral Administration of High Doses of trans-Resveratrol to Rats for 28 Days Is Not Harmful. *J. Nutr.*, v. 132, p. 257-260, 2002.

JUNG, H. J.; SEU, Y. B.; LEE, D. G. Candidicidal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *C. albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 17, p. 1324-1329, 2007.

JUNYAPRASERT, V.B., TEERANACHAIDEEKUL, V., SOUTO, E.B., BOONME, P., MÜLLER, R.H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation. *Int J Pharm*, v. 377, p. 207–214, 2009.

KAEBERLEIN, M.; RABINOVITCH, P.S. Grapes versus gluttony. *Nature*, v. 444, p. 280-282, 2006.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 123–126, p. 369–385, 2006.

KRAUEL, K.; DAVIES, N.M.; HOOK, S.; RADES, T. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. *J Control Release*, v. 106(1–2), p. 76–87, 2005.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 54(1), p. S77–S98, 2002.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E.J.; JAROSZEWSKI, J.W. NMR characterisation and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *J Control Release*, v. 69, p. 421–433, 2000.

KÜCHLER, S.; RADOWSKI, M.R.; BLASCHKE, T.; DATHE, M.; PLENDL, J.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTING, M.; KRAMER, K.D. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 71, p. 243–250, 2009.

KUHNLE, G., SPENCER, J.P.E., CHOWRIMOOTO, G., SCHROETER, H., DEBNAM, E.F., SRAI, S.K.S.; RICE-EVANS, C.; HAHN, U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 272, p. 212–217, 2000.

LADEMANN, J.; OTBERG, N.; RICHTER, H.; MEYER, L.; AUDRING, H.; TEICHMANN, A.; THOMAS, S.; KNÜTTEL, A.; STERRY, W. Application of optical non-invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Research and Technology*, v. 13, p. 119–132, 2007.

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, v.81, p. 284S–91S, 2005.

LASHMAR, U.T.; HADGRAFT, J.; THOMAS, N. Topical application of penetration enhancers to the skin of nude mice: a histopathological study. *J Pharm Pharmacol*, v. 41, p. 118–122, 1989.

LE CORRE, L.; CHALABI, N.; DELORT, L.; BIGNON, Y.J.; BERNARD-GALLON, D.J. Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 49, p. 462 – 471, 2005.

LEE, M.; KIM, S.; KWON, O.K.; OH, S.R.; LEE, H.K.; AHN, K. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic

stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *Int. Immunopharmacol.*, v.9, p. 418–424, 2009.

LI, T.; WANG, W.; CHEN, H.; LI, T.; YE, L. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SATA3 signaling. *Int. Immunopharmacol.*, v. 10, p. 18–25, 2010.

LU, X.; JI, C.; XU, H.; LI, X.; DING, H.; YE, M.; ZHUG, Z.; DING, D.; JIANG, X.; DING, X.; GUO, X. Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from A $\beta$ -induced oxidative stress. *Int J Pharm.*, v. 375, p. 89–96, 2009.

LU, Z.; CHENG, B.; HU, Y.; ZHANG, Y.; ZOU, G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. *Food Chem.*, v. 113, p. 17–20, 2009.

LUCKS, J.S.; MÜLLER, R.H. Medication vehicles made of solid lipid nanoparticles (solid lipid nanophesres SLN). EP 0000605497. *Apud* PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm.*, v. 366, p.170-184, 2009.

LV, K., YU, A., XI, Y., LI, H., SONG, Z., CUI, J., CAO, F., ZHAI, G. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *Int J Pharm.*, v. 372, p. 191–198, 2009.

MA, Z.H.; MA, Q.Y. Resveratrol: A medical drug for acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.*, v. 11(21), p. 3171-3174, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability *Am J Clin Nutr.*, v. 79, p. 727– 747, 2004.

MANJUNATH, K., REDDY, J.S., VENKATESWARLU, V. Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacology*, v. 27, n. 2, p. 127-144, 2005.

MARIER, J.F.; VACHON, P.; GRITSAS, A.; ZHANG, J.; MOREAU, J.P.; DUCHARME, M.P. Metabolism and Disposition of Resveratrol in Rats: Extent of Absorption, Glucuronidation, and Enterohepatic

Recirculation Evidenced by a Linked-Rat Model. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v. 302, p. 373, 2002.

MARRA, F.; LEVY, J.L.; SANTI, P.; KALIA, Y.N. In vitro evaluation of the effect of electrotreatment on skin permeability. *J Cosmetic Dermatol*, v. 7, p. 105–111, 2008.

MARTÍN, A.R.; VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; LASTRA, C.A. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br J Pharmacol*, v. 147, p. 873–885, 2006.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 47, p. 165–196, 2001.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 54, p. 3-17, 2002.

MING-LIANG, C.; JI, L.; WEI-RONG, X.; LEI, S.; HUA, T.; LIN, W.; LING-YAN, W.; XIANG, C.; HONG-FU, X. Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells. *J. Cent. South. Univ.*, 31, p. 635- 639, 2006.

MOULIK, S.P.; PAUL, B.K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 78, p. 99–195, 1998.

MUHAMMAD, F.; BROOKS, J.D.; RIVIERE, J.E. Comparative mixture effects of JP-8(100) additives on the dermal absorption and disposition of jet fuel hydrocarbons in different membrane model systems, *Toxicol. Lett.*, v. 150, p. 351–365, 2004.

NAZAR, M.F; KHAN, A.M.; SHAH, S.S. Microemulsion System with Improved Loading of Piroxicam: A Study of Microstructure. *AAPS PharmSciTech*, v. 10(4), p. 1286-1294, 2009.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets*, v. 16, p. 251-260, 2005.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como



sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27, p. 131-138, 2004.

OPIE, L.H.; LECOUR, S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. *Eur. Heart J.*, v. 28, p. 1683–1693, 2007.

ORTUÑO, J.; COVAS, M.I.; FARRE, M.; PUJADAS, M.; FITO, M.; KHYMENETS, O.; ANDRES-LACUEVA, C.; ROSET, P.; JOGLAR, J.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; DE LA TORRE, R. Matrix effects on the bioavailability of resveratrol in humans. *Food Chem*, v. 120, p. 1123–1130, 2010.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *In. J Pharm*, v. 366, p.170-184, 2009.

PATHAK, P.; NAGARSENKER, M. Formulation and Evaluation of Lidocaine Lipid Nanosystems for Dermal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 985-992, 2009.

PERVAIZ, S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist. Updat.*, v. 7, p. 333-344, 2004.

PIEMI, M. P. Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J. P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *J Control Release*, v. 58, n. 2, p. 177-187, 1999.

PIÑEIRO, Z.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *J Chromatography A*, v. 1110, p. 61-65, 2006.

PIRES-DE-CAMPOS, M.S.M.; LEONARDI, G.R.; CHORILLI, M., SPADARI-BRATFISCH, R.C.; POLACOW, M.L.O.; GRASSI-KASSISSE, D.M. The effect of topical caffeine on the morphology of swine hypodermis as measured by ultrasound. *J Cosmetic Dermatol*, v. 7, p. 232–237, 2008.

POPLE, P.V. & SINGH, K.K. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech.*, v.7, p.91, 2006.

POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. *Pharm. Res.*, v. 9, p. 663–669, 1992 *apud* HADGRAFT, J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm.*, v. 58, p. 291–299, 2004.

PUGLIA, C., BLASI, P., RIZZA, L., SCHOUBBEN, A., BONINA, F., ROSSI, C., RICCI, M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. *Int J Pharm.*, v. 357, p. 295–304, 2008.

RADKAR, V.; HARDEJ, D.; LAU-CAM, C.; BILLACK, B. Evaluation of Resveratrol and Piceatannol Cytotoxicity in Macrophages, T Cells, and Skin Cells. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, v. 58, p. 293-304, 2007.

RASTIJA, V.; MEDIC-SARIC, M. QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *Eur J Med Chem.*, v.44, p. 400-408, 2009.

RIZWAN, M.; AQIL, M.; TALEGAONKAR, S.; AZEEM, A.; SULTANA, Y.; ALI, A. Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents. *Recent Pat Drug Deliv Formul.*, v. 59, p. 427–443, 2009.

ROGERIOA, A.P.; DORA, C.L.; ANDRADE, E.L.; CHAVES, J.S.; SILVA, L.F.C.; LEMOS-SENNA, E.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol. Res.*, v. 61, p. 288–297, 2010.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *Int J Pharm.*, v. 372, p. 105–111, 2009.

SANNA, V.; GAVINI, E.; COSSU, M.; RASSU, G.; GIUNCHEDI, P. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *J Pharm Pharmacol.*, v. 59, p. 1057-64, 2007.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 59, p. 427–443, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SCHMIDTS, T.; NOCKER, P.; LAVI, G.; KUHLMANN, J.; CZERMAK, P.; RUNKEL, F. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, v. 340, p. 187–192, 2009.

SCHUBERT, M.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles—evaluation of the method and process parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 55, p. 125–131, 2003.

SCHULMAN, J.H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L.M. Mechanism of formation and structure of microemulsions by electron microscopy, *J. Phys. Chem.*, v. 63, p. 1677–1680, 1959 *apud* KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. S77–S98, 2002.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M., SHAFIQ, S. Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal Delivery of Aceclofenac. *AAPS PharmSciTech*, v. 8, p. E1–E9, 2007.

SHAKEEL, F.; RAMADAN, W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 75, p. 356–362, 2010.

SHANKAR, S.; SINGH, G. & SRIVASTAVA, R. K. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci*, v. 12, p. 4839–4854, 2007.

SHAO, J.; LI, X.; LU, X.; JIANG, C.; HU, Y.; LI, Q.; YOU, Y.; FU, Z. Enhanced growth inhibition effect of Resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the

induction of intracellular reactive oxygen species levels. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 72, p. 40–47, 2009.

SHISHU, RAJAN, S., KAMALPREET. Development of Novel Microemulsion-Based Topical Formulations of Acyclovir for the Treatment of Cutaneous Herpetic Infections. *AAPS PharmSciTech*, v. 10, p. 559-565, 2009.

SINKO, J.P., *Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas*. 5. Ed. São Paulo: Editora Artmed, 2008, p. 318-322.

SINTOV, A.C.; BOTNER, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int J Pharm.*, v. 311, p. 55–62, 2006.

SOLEAS, G. J.; GRASSC, L.; JOSEPHYD, P. D.; GOLDBERGB, D. M.; DIAMANDIS, E. P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, v. 35, p. 119–124, 2002.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.T; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 20, p. 145-149, 2004.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SPERNATH, A.; ASERIN, A. Microemulsions as carriers for drugs and nutraceuticals. *Adv Colloid Interface Sci*, v. 128–130, p. 47–64, 2006.

SURH, Y.J. Cancer Chemoprevention with Dietary Phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, v. 3, p. 768-780, 2003.

TEICHMANN, A.; HEUSCHKEL, S.; JACOBI, U.; PRESSE, G.; NEUBERT, R.H.H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 67, p. 699–706, 2007.

TESKAC, K.; KRISTL, J. The evidence for solid lipid nanoparticles mediated cell uptake of resveratrol. *Int J Pharm*, v. 390, p. 61–69, 2010.

TING, W.W.; VEST, C.D.; SONTHEIMER, R.D. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *Int. J. Dermatol.*, v. 43, p. 538–547, 2004.

TROMBINO, S.; CASSANO, R.; MUZZALUPO, R.; PINGITORE, A.; CIONE, E.; PICCI, N. Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 72, p. 181–187, 2009.

TROTTA, M.; DEBERNARDI, F.; CAPUTO, O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm*, v. 257, p. 153–160, 2003.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 53, p. 203–208, 2002.

ULRICH, S.; WOLTER, F.; STEIN, J.M. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 49, p. 452 – 461, 2005.

VALENZANO, D.R.; TERZIBASI, E.; GENADE, T.; CATTANEO, A.; DOMENICI, L.; CELLERINO, A. Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate. *Cur. Biol.*, v. 16, p. 296–300, 2006.

VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Prog Retin Eye Res*, v. 21, p. 15–34, 2002.

VICENTINI, F.T.M.C., SIMI, T.R.M., DEL CIAMPO, J.O., WOLGA, N.O., PITOL, D.L., IYOMASA, M.M., BENTLEY, M.V.L.B., FONSECA, M.J.V. Quercetin in w/o microemulsion: In vitro and in vivo skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated in vivo. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 69, p. 948–957, 2008.

VITRAC, X.; DESMOULIÈRE, A.; BROUILLAUD, B.; KRISA, S.; DEFFIEUX, G.; BARTHE, N.; ROSENBAUMB, J.; MÉRILLON, J. M. Distribution of [ $^{14}\text{C}$ ]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive

polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.*, v. 72, p. 2219–2233, 2003.

WALLE, T., HSIEH, F., DELEGGE, M. H., OATIS, J. E., JR., WALLE, U. K. High Absorption but very Low Bioavailability of Oral Resveratrol In Humans. *Drug Metab Dispos*, vol. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WANG, J. X., SUN, X., ZHANG, Z. R. Enhanced brain targeting by synthesis of 3', 5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, v. 54, p. 285-290, 2002.

WANG, L.; TABOR, R.; EASTOE, J.; LI, X.; HEENANC, R.K.; DONG, J. Formation and stability of nanoemulsions with mixed ionic–nonionic surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 11, p. 9772–9778, 2009.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. *Adv. Drug Deliv.*, v. 20, p. 131-145, 1996.

WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 49, p. 472 – 481, 2005.

WESTER, R.C.; MELENDRES, J.; SEDIK, L.; MAIBACH, H.; RIVIERE, J.E. Percutaneous absorption of salicylic acid, theophylline, 2, 4-dimethylamine, diethyl hexyl phthalic acid, and p-aminobenzoic acid in the isolated perfused porcine skin flap compared to man in vivo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 151, p. 159–165, 1998.

WESTESEN, K; SIEKMANN, B. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles, *Int J Pharm*, v. 151, p. 35–45, 1997.

WILLIAMS, L.D.; BURDOCK, G.A.; EDWARDS, J.A.; BECK, M.; BAUSCH, J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem. Toxicol.*, v. 47, p. 2170–2182, 2009.

WILLIAMSON, G. & MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.81, p. 243S–55S, 2005.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 56, p. 1257–1272, 2004.

WISSING, S.A. & MULLER, R.H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm*, v.254, p. 65-68, 2003.

YAO, Q. HOU, S.X., HE, W.L., FENG, J.L., LAO, F.X., CHEN, Z.H. Study on release of resveratrol from chitosan nanoparticles. *Chinese Pharmaceutical Journal*, v. 41, p. 442-445, 2006.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. *Int J Pharm*, v. 307, p. 232-238, 2006.

YU, C.; SHIN, Y.G.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J.W.; LEE, Y.S.; HIRSCHELMAN, W.H.; PEZZUTO, J.M.; MEHTA, R.G.; BREEMEN, R.B.V. Human, Rat, and Mouse Metabolism of Resveratrol. *Pharm. Res.*, v. 19, p. 1907-1914, 2002.

YUAN, J.S.; ANSARI, M.; SAMAAN, M.; ACOSTA, E.J. Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine. *Int J Pharm*, v. 349, p. 130–143, 2008.

ZHOU, H.; YUE, Y.; LIU, G.; LI, Y.; ZHANG, J.; GONG, Q.; YAN, Z.; DUAN, M. Preparation and Characterization of a Lecithin Nanoemulsion as a Topical Delivery System. *Nanoscale Res. Lett.*, v. 5, p. 224–230, 2009.

ZHU, W.; XU, L.; MA, J.; YANG, R.; CHEN, Y. Effect of the thermodynamic properties of W/O microemulsions on samarium oxide nanoparticle size. *J Colloid Interface Sci*, v. 340, p. 119–125, 2009.